



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Institut National Polytechnique de Toulouse*
Discipline ou spécialité : *Génie des procédés environnementaux*

Présentée et soutenue par

Anne-Claire CHORIN

Date prévue de soutenance : *le 10 Novembre 2009*

Synthèse enzymatique de nouveaux dérivés
dithiolopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*

JURY

M. Jean-Luc PERNODET	<i>Rapporteur</i>
M. Nasserline SABAOU	<i>Rapporteur</i>
Mme. Florence MATHIEU	<i>Directrice de Thèse</i>
M. Ahmed LEBRIHI	<i>Directeur de Thèse</i>
Mme. Geneviève BAZIARD	<i>Examinatrice</i>
M. Stéphane GUILLOUET	<i>Examineur</i>

Ecole doctorale : *Mécanique, Energétique, Génie Civil et Procédés (MEGEP)*
Unité de recherche : *Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse (UMR 5503)*
Directeurs de thèse : *Florence Mathieu et Ahmed Lebrihi*

Remerciements

Je tiens à remercier Jean-Luc PERNODET, directeur de recherche à l'Institut de Génétique et de Microbiologie (CNRS, UMR 8621, Université Paris-sud) et Nasserline SABAOU, professeur à l'Ecole Nationale Supérieure d'Alger pour avoir évalué mon manuscrit et au-delà pour leurs remarques pertinentes et leur enthousiasme pour ce projet. Merci également à Geneviève BAZIARD, professeur à l'Université des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse et à Stéphane GUILLOUET, maître de conférences à l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, pour leur participation à mon jury de thèse et leur regard original et instructif sur ces travaux.

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse et plus particulièrement du département Bioprocédés et Systèmes Microbiens sur le site de l'Ecole Nationale d'Agronomie de Toulouse. Elle a été dirigée par Florence MATHIEU et Ahmed LEBRIHI, professeurs à l'Institut National Polytechnique de Toulouse et plus particulièrement à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Toulouse. Je les remercie pour m'avoir accueilli au laboratoire et avoir su donner les bonnes directions à ces travaux ce qui m'a permis d'obtenir les résultats présentés ici. Merci de m'avoir emmené au bout de cette aventure.

Je remercie également le Ministère Français de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour avoir financé durant ces trois ans mon allocation sans laquelle je n'aurais pas pu réaliser cette thèse.

Au sein du Laboratoire de Génie Chimique, je souhaite exprimer ma profonde gratitude et dire toute mon affection à Patricia NOUVET et Marie-Carmen MONJE pour leur soutien et leur joie de vivre, Viva España ! Vous avez toujours été là dans les hauts et dans les bas et je n'oublierai pas toutes les émotions partagées. Surtout restez comme vous êtes. Un grand merci aussi à Gwenaëlle JARD pour cette entraide à toutes épreuves pendant la thèse et avant !! Je te remercie Dr JaJard et te souhaite plein de réussite et de bonheur pour la suite. J'espère qu'on partagera encore plein de bons moments. Je remercie aussi Caroline STRUB pour ces longs débats saccharothrixiques...et Céline CAUBERE pour sa participation importante à ces travaux dans le cadre de son stage de fin d'étude à l'INSAT. Mais j'ai également une pensée pour tous les autres membres du laboratoire Thierry LIBOZ, José RAYNAL, Annie PFOHL-LESZKOWICZ, Gérard et son gâteau de crêpe et tous les étudiants

qui se sont succédé pendant 3 ans : Nafees, Rafik, Farida, Rabiâa, Slim, Riba, Nesserine, Jessica, Diana, Florent, Aurélie, Samia, Ali, André, Virginie, Mariana, Kheira... Enfin, Muriel tu es partie du labo trop vite, mais je n'oublie pas ton passage. Je te souhaite plein de bonnes choses avec ton lutin.

Je tiens également à signifier toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres du Laboratoire de Chimie Pharmaceutique de l'Université des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse pour leur chaleur humaine et le nouveau départ qu'ils ont su donner à ce projet. Je tiens à mentionner à ce titre, Laurent BIJEIRE, Geneviève BAZIARD et Salomé El HAGE. Laurent, merci pour ton investissement, ta passion et tes si bons conseils, notre travail à quatre bras m'a vraiment permis de rebondir, un vrai déclic!!

A l'ENSAT, ils sont aussi nombreux à m'avoir encouragé avec un petit mot, des conseils ou avec le matériel et le produit qui va bien. Je ne citerai que Jérôme SYLVESTRE, Georges MERLINA, Hélène MANSE, Caroline MOLETTE, Hervé REMIGNON, Nathalie MARTY-GASSET, Gérard SURAN, les étudiants d'ECOLAB Bertrand, Timothé, Laure, Gaëlle, Marion mais j'en oublie certainement ...

Par ailleurs ma thèse n'aurait pas été la même sans mes activités d'enseignement. Je remercie donc Eric PINELLI pour sa bonne humeur, les longues discussions que nous avons eues et son apprentissage de la « microbiologie facile »

Je souhaite aussi adresser mes remerciements au Pr Arnold Demain, (Drew University, Madison, NJ, USA) ainsi qu'à Mr Olivier Coulon pour leur aide dans la rédaction de ma publication.

Enfin, je n'aurais pas pu surmonter ces trois années sans un soutien extérieur à toute épreuve. Pour cela je remercie tous mes amis qui ont fait preuve d'une très grande compréhension et ont su me divertir.

Je tiens aussi à exprimer tout mon amour à mon cher « nono » qui a été tellement patient, à l'écoute (même à des milliers de km !) et dont la zen attitude me fait tant de bien.

Je remercie pour terminer toute ma famille. Merci à mes sœurs Stéphanie, Delphine et à mes parents Catherine et Patrick, pour m'avoir communiqué cette soif d'apprendre et pour tout leur amour et soutien. Enfin je ne pourrais pas finir ces remerciements sans avoir une pensée émue pour mon grand-père qui nous a quittés un peu avant le grand jour, qui aurait tellement aimé pouvoir faire des études et qui a su transmettre à ses enfants et petits enfants cette envie de connaissances.

Résumé

Saccharothrix algeriensis est une bactérie filamenteuse productrice de plusieurs molécules de la famille des dithiolopyrrolones aux propriétés à la fois antibiotiques et anticancéreuses. Ces composés sont constitués d'un noyau bicyclique commun, la pyrrothine, lié par une liaison amide à différents radicaux acyls (R). Lors de ce projet de thèse, la réaction enzymatique d'acylation du noyau pyrrothine, dite pyrrothine N-acyltransférase, a été étudiée chez *Sa. algeriensis* pour mieux comprendre la régulation exercée par les acides organiques sur la biosynthèse des dithiolopyrrolones et synthétiser par voie enzymatique de nouveaux composés avec différents radicaux R. Deux activités enzymatiques pyrrothine N-acétyltransférase et N-benzoyltransférase catalysant la formation de deux dithiolopyrrolones, la thiolutine (R= CH₃) et la benzoyl-pyrrothine (BEP, R= C₆H₅) ont d'abord été mise en évidence dans l'extrait cellulaire brut de *Sa. algeriensis*. Ensuite la régulation exercée par les acides organiques a été étudiée en mesurant ces activités enzymatiques dans des extraits cellulaires de *Sa. algeriensis* obtenus au cours de cultures sur différents milieux supplémentés en acides organiques. Les résultats obtenus montrent que l'augmentation de la production de BEP en présence d'acide benzoïque à 1,25 mM est en partie due à l'induction de l'activité benzoyltransférase. Par ailleurs, les activités acétyltransférase et benzoyltransférase ont montré des profils d'expression très différents qui laissent supposer que deux enzymes catalysent le transfert de l'acétyl- et du benzoyl-. Leur purification a aussi été entreprise et l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis*, sous une forme brute ou semi-purifiée, a été utilisé pour catalyser la synthèse enzymatique de 9 dérivés dithiolopyrrolones, susceptibles de posséder des activités biologiques innovantes et/ou accrues.

Abstract

Saccharothrix algeriensis is a filamentous bacterium that produces many dithiolopyrrolone compounds with antibiotic and anti-tumour properties. These metabolites possess a common bicyclic nucleus, the pyrrothine, amide linked with variable acyl groups R. During this PhD project, the enzymatic reaction of pyrrothine acylation, identified as pyrrothine N-acyltransferase, was studied in *Sa. algeriensis* to further our understanding of the regulation exerted by organic acids on the dithiolopyrrolone biosynthesis and to produce new dithiolopyrrolone compounds by enzymatic catalysis. Evidence for the presence in the crude cell free extract of *Sa. algeriensis* of two enzymatic activities, pyrrothine N-acetyltransferase and N-benzoyltransferase is provided. They catalyze respectively the formation of the two dithiolopyrrolones, thiolutin (R= CH₃) and benzoyl-pyrrothine (BEP, R = C₆H₅). To study the regulation exerted by organic acids, these enzymatic activities were then assayed in crude cell free extracts of *Sa. algeriensis* obtained during cultures on media supplemented with organic acids. The results show that BEP-production is enhanced in the presence of benzoic acid partly because of an induction of pyrrothine N-benzoyltransferase. Differences in the expression time courses of pyrrothine N-acetyltransferase and N-benzoyltransferase activities were also observed. It supports the idea that the transfer reactions of acetyl-CoA and benzoyl-CoA on pyrrothine are catalyzed by two different enzymes. Their purification was undertaken and the cell free extract, crude or semi-purified was used as catalyst to synthesize nine dithiolopyrrolones with biological activities potentially new and better.

Sommaire

Liste des abréviations	1
Introduction	4
Chapitre I. Bibliographie	9
I.1. <i>Saccharothrix algeriensis</i>	9
I.1.1. <i>Saccharothrix algeriensis</i> : un actinomycète	9
I.1.2. Une bactérie appartenant au genre <i>Saccharothrix</i>	12
I.1.3. Caractéristiques de l'espèce <i>Saccharothrix algeriensis</i>	13
I.2. Les dithiolopyrrolones	16
I.2.1. Sources biologiques	17
I.2.1. Voie de biosynthèse	20
I.2.2. Synthèse chimique	20
I.2.3. Propriété physico-chimiques et spectroscopiques	21
I.2.4. Activités biologiques	23
I.2.5. Toxicité	25
I.2.6. Mode d'action antimicrobien	25
I.2.7. Applications	25
I.3. Mécanismes de régulation de la production d'antibiotiques chez les actinomycètes	26
I.3.1. Influence des sources nutritionnelles	27
I.3.2. Influence du taux de croissance	38
I.3.3. Induction du métabolisme secondaire	39
I.4. Influence du milieu de culture sur la croissance et la production des dithiolopyrrolones de <i>Sa. algeriensis</i>	43
I.4.1. Recherche d'un milieu synthétique pour la croissance de <i>Sa. algeriensis</i>	44
I.4.2. Cinétique de production et de croissance des dithiolopyrrolones sur milieu semi-synthétique	46
I.4.3. Influence de l'ajout de précurseurs sur la production des dithiolopyrrolones	47
I.4.4. Influence de l'ajout de précurseurs sur la production de nouvelles dithiolopyrrolones	51
I.5. Les acyltransférases	52
I.5.1. Nomenclature	52
I.5.2. Fonctions métaboliques	52
I.5.3. Méthodes de dosage	53
I.5.4. Les N-acétyltransférases qui ressemblent au facteur GCN5 (les GNAT)	54

Chapitre II. Matériel et méthodes	58
II.1. Appareillage et produits chimiques	58
II.2. Microorganisme	59
II.3. Cultures microbiennes	59
II.3.1. Milieux de culture	59
II.3.2. Conditions de culture	61
II.3.3. Méthodes analytiques	62
II.4. Synthèse de la pyrrothine par voie semi-biologique	65
II.4.1. Production microbiologique des dithiopyrrolones	65
II.4.2. Extraction des dithiopyrrolones	65
II.4.3. Hydrolyse acide	65
II.4.4. Mise en évidence de la pyrrothine	66
II.4.5. Purification par chromatographie sur couche épaisse (CCE)	67
II.4.6. Purification par HPLC semi-analytique	68
II.5. Synthèse de la pyrrothine par voie chimique	69
II.5.1. Réaction (a): formation de la 1,3-bis-(4-méthoxy-benzylsulfanyl)-propan-2-one (2).	71
II.5.2. Réaction (b) et (c): formation de la 3-hydroxy-4-(4-méthoxybenzylsulfanyl)-5-[(4-méthoxybenzylsulfanyl)méthylidène]-1-méthyl-1H-pyrrol-2(5H)-one (3, iso A et iso B).	71
II.5.3. Réaction (d): formation de la 3-amino-4-(4-méthoxybenzylsulfanyl)-5-[(4-méthoxybenzylsulfanyl)méthylidène]-1-méthyl-1H-pyrrol-2(5H)-one (4, iso A et iso B).	72
II.5.4. Réaction (e): Formation du 2,2,2-trifluoro-N-(4-méthyl-5-oxo-4,5-dihydro-[1,2]-dithiolo-[4,3-b]pyrrol-6-yl)-acétamide (5).	73
II.5.5. Réaction (f): Formation de l'hydrochlorure de la 6-amino-4-méthyl-[1,2]-dithiolo-[4,3-b]pyrrol-5-one (6): la pyrrothine	73
II.6. Préparation d'un extrait cellulaire de <i>Saccharothrix algeriensis</i> pour des études d'expression	74
II.6.1. Récupération et lavage de la biomasse	74
II.6.2. Extraction des protéines	74
II.7. Test d'activité acyltransférase	74
II.7.1. Réaction enzymatique	74
II.7.2. Dosage du produit initialement présent dans les extraits	76
II.7.3. Dosage HPLC et LC-MS	76
II.7.4. Dosage des protéines	78
II.7.5. Expression de l'activité	79
II.8. Purification partielle des activités pyrrothine N-acyltransférases	80
II.8.1. Etapes de purifications	80

II.8.2.	Méthodes analytiques pour le suivi de la purification	86
II.8.3.	Grandeurs de suivi de la purification	87
II.9.	Etude de l'évolution des activités enzymatiques au cours de leur conservation	87
II.9.1.	Evolution dans la biomasse et dans l'extrait à - 80 °C	87
II.9.2.	Evolution dans l'extrait à 4 °C avec ou sans dialyse	88
II.9.3.	Influence du cocktail anti-protéases	88
II.10.	Répétition des expériences et analyse statistique	89
Chapitre III.	Synthèse de la pyrrothine	91
III.1.	Synthèse semi-biologique de la pyrrothine	92
III.1.1.	Obtention des dithiolopyrrolones	92
III.1.2.	Hydrolyse acide	93
III.2.	Tentatives de purification	96
III.2.1.	Purification sur CCE	97
III.2.2.	Purification sur HPLC semi-analytique	98
III.2.3.	Stabilité de la pyrrothine	99
III.3.	Synthèse chimique de la pyrrothine	101
III.4.	Discussion	101
Chapitre IV.	Expression des activités pyrrothine N-acyltransférases chez <i>Sa. algeriensis</i> NRRL B-24137	106
IV.1.	Implication d'activités enzymatiques pyrrothine N-acyltransférases dans la production de thiolutine et de benzoyl-pyrrothine (BEP).	107
IV.2.	Productions de biomasse, de thiolutine et de BEP sur milieu SS	108
IV.3.	Ajout d'acide benzoïque et d'acide acétique au milieu de culture	109
IV.4.	Expression des activités pyrrothine N-acyltransférases sur milieu SS	111
IV.5.	Expression des activités pyrrothine N-acyltransférases sur milieu SS supplémenté en acides organiques	113
IV.6.	Discussion	115
Chapitre V.	Purification partielle de(s) activité(s) pyrrothine N-acyltransférase(s)	120
V.1.	Evolution des activités acétyltransférase et benzoyltransférase au cours du temps	121

V.1.1.	Conservation de la biomasse à -80 °C	121
V.1.2.	Conservation de l'extrait cellulaire à -80 °C	121
V.1.3.	Conservation de l'extrait cellulaire à 4 °C	122
V.1.4.	Influence du cocktail anti-protéases	123
V.2.	Détection de l'activité benzoyltransférase sur Native-Page	123
V.3.	Optimisation de l'extraction	124
V.3.1.	Influence du temps d'extraction	125
V.3.2.	Influence de la quantité de biomasse extraite	125
V.4.	Optimisation de la précipitation au sulfate d'ammonium	127
V.5.	Chromatographie d'échange d'anions (AEX)	128
V.6.	Chromatographie d'interactions hydrophobes (HIC)	130
V.7.	Bilan de purification	132
V.8.	Discussion	133
Chapitre VI. Synthèse enzymatique de nouveaux dérivés dithiolopyrrolones par un extrait cellulaire de <i>Sa. algeriensis</i>		139
VI.1.	Synthèse enzymatique de dérivés pyrrothines avec un extrait cellulaire de <i>Sa. algeriensis</i>	139
VI.1.1.	Dérivés obtenus	139
VI.1.2.	Cinétique d'expression des activités pyrrothine N-acyltransférases	144
VI.2.	Synthèse enzymatique de dérivés holothines avec un extrait cellulaire de <i>Sa. algeriensis</i>	145
VI.3.	Influence de l'ajout d'acides organiques dans le milieu de culture sur la synthèse enzymatique de nouveau dérivés dithiolopyrrolones	148
VI.1.	Synthèse enzymatique de dérivés pyrrothines avec l'extrait cellulaire semi-purifié	149
VI.2.	Discussion	151
Conclusions générales et perspectives		156
Références bibliographiques		162
ANNEXE 1 : Appareillage, produits et consommables		189
ANNEXE 2 : Synthèse du standard de thiolutine		193
ANNEXE 3 : Spectre RMN ¹H obtenus lors de la synthèse de l'holothine		195

<i>ANNEXE 4 : Spectres RMN ¹H obtenus lors de la synthèse de la pyrrothine</i>	<i>200</i>
<i>ANNEXE 5 : Analyse HPLC et spectre UV de la pyrrothine</i>	<i>205</i>
<i>ANNEXE 6 : Abaque utilisé pour la réalisation de la précipitation au sulfate d'ammonium</i>	<i>206</i>
<i>ANNEXE 7 : Spectres de masse des dérivés dithiopyrrolones synthétisés avec un extrait cellulaire brut de Sa. algeriensis</i>	<i>207</i>
<i>ANNEXE 8 : Spectres de masse des dérivés dithiopyrrolones synthétisés avec un extrait cellulaire partiellement purifié de Sa. algeriensis.</i>	<i>209</i>
<i>ANNEXE 9 : Publication acceptée</i>	<i>211</i>

Liste des abbréviations

AcOEt: Acétate d'éthyle
ACV: δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cystéinyl-D-valine
ADN: Acide desoxyribonucléique
ADNr: Acide desoxyribonucléique ribosomal
aq.: Aqueux
ARN: Acide ribonucléique
ARNm: Acide ribonucléique messenger
ARNr: Acide ribonucléique ribosomal
ATP: Adénosine triphosphate
BSA: Albumine de sérum bovin
CCE: Chromatographie sur couche épaisse
CCM: Chromatographie sur couche mince
CoA: Coenzyme A
CYS: Cystéine
 δ : Déplacement chimique
DI: diamètre interne
DL₅₀: Dose létale 50, dose entraînant la mort de 50 % des individus
DMF: Diméthylformamide
DMSO: Diméthylsulfoxyde
DTT: Dithiothréitol
EDTA: Acide éthylène diamine tétra acétique
EI-MS: Spectrométrie de masse par impact électronique
 ϵ : Coefficient d'extinction molaire ou absorptivité molaire
éq.: Equivalent
ESI-MS: Spectrométrie de masse avec ionisation par électrospray
EtOH: Ethanol
Et₂O: Diéthyl éther
Et₃N: Triéthylamine
F: Point de fusion
FP: Facteur de purification

IR: Rayonnement infrarouge
MeOH: Méthanol
MET: Méthionine
MIBC: Méthylisobutylcétone
MOPS: Acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique
MS: Masse sèche
m/z: Rapport masse sur charge
NADPH: Nicotine adénine dinucléotide phosphate réduit
PAGE: « PolyAcrylamide Gel Electrophoresis », Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
PCR: « Polymerase Chain Reaction », Amplification en chaîne par polymérase
PMB: p-Méthoxybenzylamine
PVDF: Polyfluorure de vinylidène
ppm: Partie par million
q.s.p.: Quantité suffisante pour
R: Rendement
Rf: Rapport frontal
RMN: Résonnance magnétique nucléaire
RPM: Rotation par minute
SER: Sérine
TCA: Acide trichloroacétique
TFA: Acide trifluoroacétique
THF: Tétrahydrofurane
THR: Thréonine
Tr: Temps de rétention
Tris: Trishydroxyméthylaminométhane
TYR: Tyrosine
U.A.: Unité d'absorbance
UFC: Unité formant colonie
UV: Rayonnement ultraviolet
VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

INTRODUCTION

Introduction

Dans les années 1990 la découverte de métabolites bioactifs d'origine microbienne a progressé de manière exponentielle grâce aux progrès technologiques. Malheureusement, parmi les métabolites découverts, nombreux sont des analogues de molécules déjà connues, des composés n'ayant pas d'activité antibiotique ou encore des composés mineurs. La découverte de nouvelles familles chimiques innovantes se raréfie (Berdy 2005). Pourtant de nouveaux besoins émergent. Des germes multi-résistants (Sharma *et al.* 2005) et de nouveaux virus apparaissent. Il y a aussi une résurgence des mycobactéries et un manque en molécules antifongiques et antitumorales. Face à ces besoins, de nouveaux composés chimiques doivent donc être identifiés et la recherche de nouvelles molécules bioactives évolue.

En premier lieu, la biodiversité est exploitée. De nouvelles méthodes ont été développées pour isoler les genres et espèces rares. En 2008, Hayakawa a rapporté notamment un ensemble de techniques d'isolement sélectives des actinomycètes rares (autres que *Streptomyces*). Ces techniques incluent des méthodes de pré-traitement et d'enrichissement des échantillons de départ et l'usage de milieux de culture adaptés, enrichis notamment avec des agents antimicrobiens spécifiques. Cet auteur décrit par exemple un procédé d'isolement sélectif du genre *Microbispora* incluant le séchage à sec à 120 °C pendant 1 h d'un échantillon de sol puis son traitement avec une solution de phénol à 1,5 % et de gluconate de chlorhexidine à 0,03 %. Les taxons rares sont aussi recherchés dans des échantillons issus de biotopes extrêmes (Sabaou *et coll.* 1998, Lazzarini *et al.* 2000). En outre, un nouveau concept, la métagénomique permet d'exploiter les populations microbiennes non cultivables (Peric-Concha and Long 2003). L'ADN d'un échantillon de l'environnement, le métagénome, est extrait puis cloné dans des vecteurs artificiels qui sont transformés dans des hôtes de substitution. Ces banques d'ADN environnemental sont ensuite screenées pour leurs activités biologiques (Zhang 2005). Les méthodes de screening des activités biologiques s'améliorent aussi. Des souches tests plus sensibles sont créées pour détecter des agents anti-microbiens à de faibles concentrations (Hsieh *et al.* 1998). De nouvelles méthodes de quantification de la croissance et de la viabilité bactérienne sont utilisées pour détecter l'effet bactériostatique ou bactéricide des molécules screenées (Collins and Franzblau 1997). Certains tests permettent aussi de sélectionner des molécules qui inhibent des cibles moléculaires précises chez la bactérie pathogène cible (enzymes, flagelle...) (Santoro *et al.* 2006, Malapaka *et al.* 2007). De

plus, l'automatisation des tests permet le screening de plusieurs milliers d'échantillons par jour et par robot (Berdy 2005). Parallèlement, les connaissances se développent sur les voies de biosynthèse des molécules déjà découvertes et ces connaissances permettent ensuite d'exploiter la flexibilité naturelle du système de production pour la synthèse de nouveaux dérivés. Ainsi, l'ajout de précurseurs des métabolites au milieu de culture permet de diriger la production vers de nouveaux analogues de ces métabolites (Bouras *et al.* 2008). Au-delà même de la synthèse dirigée par les précurseurs, la modification des gènes de biosynthèse par ingénierie métabolique permet à la fois d'augmenter les rendements de production mais aussi de produire de nouvelles molécules, appelées aussi antibiotiques hybrides (Niemi 1995). Enfin, la modification chimique ou enzymatique de composés naturels, ou semi-synthèse, permet d'obtenir de nouvelles molécules bioactives possédant des propriétés biologiques accrues. Un remarquable exemple est la production de β -lactames semi-synthétiques. La recrudescence des bactéries résistantes à la pénicilline G a entraîné l'abandon progressif de son usage clinique. Par la suite, l'acylation du noyau de la pénicilline G, l'acide 6-amino pénicillanique (6-APA), avec des chaînes variables a permis la synthèse de β -lactames semi-synthétiques de seconde génération, actifs contre les bactéries résistantes. Les plus notables sont l'amoxicilline et l'ampicilline dont les chaînes latérales sont le D-phénylglycyl- et le D-*p*-hydroxyphénylglycyl- respectivement. Par la suite des dérivés des noyaux céphalosporiniques, l'acide 7-aminocéphalosporinique (7-ACA) et l'acide 7-amino-3-desacétoxycephalosporinique (7-ADCA), ont aussi été utilisés cliniquement. Jusqu'en 1985, la synthèse des noyaux tout comme leur dérivation était réalisée par voie chimique. Mais cette méthode de synthèse souffre d'inconvénients majeurs comme l'importance des déchets générés (dans le cas de la céphalexine, 30 à 40 kg de déchets par kg de produit). Depuis 1985, de nombreux procédés enzymatiques qui génèrent une faible consommation énergétique et peu de déchets ont donc été développés pour une semi-synthèse enzymatique de ces composés (formation des noyaux et dérivations) (Wegman *et al.* 2001). La semi-synthèse de nouveaux glycopeptides, dérivés de la vancomycine, est par ailleurs en cours de développement pour répondre aux besoins accrues de molécules actives contre les bactéries à Gram positif, résistantes aux antibiotiques (*Staphylococcus aureus* et certains *Enterococci*). Ainsi, des lipoglycopeptides, comme la dalbavancine, la télavancine ou l'oritavancine s'avèrent des plus prometteurs (Perez *et al.* 2008).

Cette étude s'inscrit dans cette volonté de découvrir et de synthétiser de nouvelles molécules bioactives. Elle illustre les tendances actuelles dans le développement de ces

molécules, notamment l'utilisation de la biodiversité comme source de molécules bioactives, la compréhension des mécanismes de synthèse et de régulation des métabolites secondaires ainsi que la semi-synthèse de nouveaux composés.

Saccharothrix algeriensis NRRL B-24137 a été isolée à partir d'un échantillon de sol collecté dans la palmeraie d'Adrar au sud de l'Algérie. La souche bactérienne, appartenant à un genre d'actinomycète dit « rare », s'est avérée productrice de plusieurs molécules de la famille des dithiopyrrolones possédant des propriétés antibiotiques et anticancéreuses. Cette famille de composés regroupe des dérivés possédant un bi-hétérocycle 1,2-dithiolo-[4,3-b]pyrrol-5(4H)-one, aussi appelé noyau pyrrolinonodithiole ou pyrrolinodithiole. Les dithiopyrrolones produites par *Sa. algeriensis* sont constituées d'un noyau pyrrothine qui dérive du bi-hétérocycle et diffèrent entre elles par la nature de l'acide organique relié au noyau par une liaison amide exocyclique (Lamari *et al.* 2002a, b, Zitouni *et al.* 2004).

Sa. algeriensis a démontré une étonnante capacité à produire une grande diversité de dithiopyrrolones. Plusieurs dithiopyrrolones sont produites sur un milieu basal et l'ajout d'acides organiques au milieu de culture a permis par ailleurs d'aboutir à la synthèse de plusieurs nouveaux dérivés (Bouras *et al.* 2008). Cependant, peu de travaux permettent d'expliquer la grande flexibilité de ce microorganisme dans l'usage de différents substrats pour la synthèse des dithiopyrrolones. En effet, les voies de biosynthèse des dithiopyrrolones ont fait l'objet de peu d'étude. Seuls Furumai *et al.* (1982) et De La Fuente *et al.* (2002) ont rapporté l'existence, chez d'autres microorganismes, d'une réaction d'acylation d'un noyau pyrrothine ou holothine par un acide organique activé sous forme d'acyl-CoA dans la formation des dithiopyrrolones. Cependant, aucune enzyme de la voie de biosynthèse n'a encore été purifiée.

L'objet premier de ce travail de thèse est la mise en évidence d'une activité enzymatique d'acylation du noyau pyrrothine (réaction pyrrothine N-acyltransférase) chez *Sa. algeriensis* et l'usage de la ou les enzymes impliquées (dans l'extrait brut ou partiellement purifiée) pour la synthèse de nouveaux dérivés dithiopyrrolones. Mais au-delà de cet objectif primaire, l'étude de cette réaction enzymatique a aussi consisté à :

- Développer un outil pour la compréhension de la régulation nutritionnelle exercée sur la production des dithiopyrrolones
- Appliquer cet outil à l'étude de l'influence des acides organiques sur la synthèse des dithiopyrrolones

- Avancer dans la purification de la ou les enzymes afin d'obtenir une séquence protéique (celle d'une enzyme à activité pyrrothine N-acyltransférase) qui constituerait un outil pour la recherche des gènes de biosynthèse des dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis*.

A travers l'étude de cette réaction enzymatique, l'objectif de ce travail est donc plus largement d'approfondir les connaissances sur la voie de biosynthèse des dithiopyrrolones. Ces connaissances doivent ensuite permettre à long terme de produire des dithiopyrrolones par voie biologique (enzymatique ou microbiologique) avec un rendement accru et surtout de contrôler la nature des radicaux variables des dithiopyrrolones formées.

Dans une première partie, la synthèse de la pyrrothine, substrat de la réaction enzymatique pyrrothine N-acyltransférase a été réalisée. Deux voies de synthèse ont été mises en œuvre pour la synthèse de cette molécule : une voie semi-biologique et une voie chimique.

Dans un deuxième temps, l'existence d'une activité enzymatique pyrrothine N-acyltransférase a été mise en évidence chez *Sa. algeriensis* envers deux substrats modèles : l'acétyl-CoA et le benzoyl-CoA. La quantification de ces activités enzymatiques au cours de cultures de *Sa. algeriensis* sur différents milieux supplémentés en acides organiques a aussi permis d'étudier la régulation exercée par les acides organiques sur ces systèmes enzymatiques.

Par la suite, les activités pyrrothine N-acyltransférases identifiées ont été partiellement purifiées.

Enfin la synthèse enzymatique de différents dérivés dithiopyrrolones a été entreprise à partir de pyrrothine (ou holothine) et de différents acyls-CoA. La catalyse a été réalisée par un extrait cellulaire de *Sa. algeriensis* sous une forme brute ou semi-purifiée.

CHAPITRE I

Etude bibliographique

Chapitre I. Bibliographie

I.1. *Saccharothrix algeriensis*

I.1.1. *Saccharothrix algeriensis* : un actinomycète

Saccharothrix algeriensis appartient à un ensemble de bactéries, les actinomycètes, regroupées dans le volume 4 de la première édition du Bergey's manual of systematic bacteriology (Holt 1989). Ce sont des bactéries aérobies à Gram positif possédant un pourcentage en guanine et cytosine supérieur à 50 % et qui se caractérisent par la formation de filaments ramifiés ou hyphes et de spores asexuées (Prescott *et coll.* 2003). Par leur morphologie générale, ces bactéries ressemblent donc aux champignons.

I.1.1.1. Les actinomycètes rares

Le genre *Streptomyces* prédomine très largement au sein des souches d'actinomycètes isolées même si les genres *Nocardia* et *Micromonospora* sont relativement abondants (Sabaou *et coll.* 1998, Lechevalier and Lechevalier 1967). Les actinomycètes, qui n'appartiennent pas au genre *Streptomyces* et qui sont sous-représentés parmi les isolats avec des techniques d'isolement classiques, sont dits rares. Ils appartiennent, entre autres, aux genres *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Amycolatopsis*, *Actinomadura* ou *Saccharothrix*.

I.1.1.2. Habitat des actinomycètes

Dans le sol les actinomycètes représentent 10 à 20 % de la population microbienne totale (Dommergues et Mangenot 1970, Takahashi and Omura 2003) où ils jouent un rôle majeur dans la décomposition des matières organiques. Mais les actinomycètes, notamment les genres *Actinoplanes* et *Micromonospora*, sont également présents dans les milieux aquatiques, en eau douce (Willoughby 2006) comme en milieu marin (Cross 1981). Des actinomycètes ont été isolés à partir d'habitats variés (Goodfellow and Williams 1997, Takahashi and Omura 2003) tels que des champs cultivés, des paturages, des forêts, des rizières, des feuilles fraîches, des résidus végétaux, des sédiments marins ou de lacs, des

mangroves ou encore des étangs. Certaines espèces ont en outre été isolées à partir de milieux extrêmes: des sols pollués contenant des métaux (Jordan and Lechevalier 1975), des hydrocarbures ou du pétrole (Nesterenko *et al.* 1978), des eaux usées, des sols issus de milieux climatiques extrêmes, désertiques (Takahashi *et al.* 1996, Boudjella *et al.* 2006, Badji *et al.* 2007,) ou glaciaires (Bozal *et al.* 2009), de l'eau des fjords (Hakvag *et al.* 2008) ou de milieux hypersalés (Senthilkumar *et al.* 2005, Al-Mueini *et al.* 2007, Tang *et al.* 2009) .

I.1.1.3. Intérêt biotechnologique des actinomycètes

Les actinomycètes suscitent l'intérêt car ce sont des producteurs majeurs de molécules bioactives et d'enzymes.

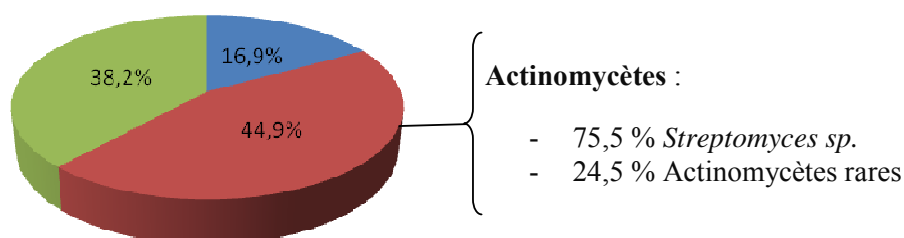


Figure I-1 Origine des produits microbiens bioactifs : produits issus de bactéries non actinomycétales ■, de bactéries actinomycétales ■, de champignons microscopiques ■ d'après Berdy (2005).

Ainsi, les actinomycètes sont producteurs de 45 % des molécules bioactives découvertes (données de 2002, Figure I-1, Tableau I-1).

Parmi ces molécules bioactives, les agents antimicrobiens, c'est-à-dire les molécules qui inhibent la croissance de microorganismes, tiennent une place importante en nombre et en importance thérapeutique. Les céphamycines de *Streptomyces clavuligerus* sont utilisées contre les bactéries à Gram négatif et positif. L'aminoglycoside kanamycine produit par *Streptomyces griseus* est utilisé contre les bactéries entériques Gram négatives. Le polykétide nystatine, produit par *Streptomyces noursei* est utilisé comme antifongique pour lutter contre les infections causées par *Candida albicans*. En outre, certaines molécules produites par des actinomycètes sont aussi utilisées dans la lutte contre les bactéries résistantes aux antibiotiques. A titre d'exemple, le glycopeptide vancomycine, produit par *Streptomyces orientalis*, est utilisée dans le traitement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthycilline (Rokem *et al.* 2007).

Tableau I-1 Nombre approximatif de produits microbiens bioactifs (2002) d'après Berdy (2005).
Antibiotiques : molécules possédant une activité antimicrobienne et/ou une activité antitumorale et/ou une activité antivirale

Source	Antibiotiques	Autres métabolites bioactifs	Total des métabolites bioactifs	Métabolites utilisés (en thérapie humaine)	Métabolite inactifs
Bactéries (autres)	2900	900	3800	10-12 (8-10)	3000 à 5000
Actinomycétales	8700	1400	10100	100-120 (70-75)	5000 à 10000
<i>Streptomyces sp.</i>	6550	1080	7630		
Actinomycétales rares	2250	220	2470		
Champignons	4900	3700	8600	30-35 (13-15)	2000 à 15000
Total	16500	6000	22500	140-160 (100)	20000 à 25000

Mais au-delà de leur capacité à produire des agents antimicrobiens, les actinomycètes sont aussi une grande source de molécules possédant des activités biologiques variées telles que des agents antitumoraux, des antiviraux, des immuno-suppresseurs, des inhibiteurs d'enzymes ou encore des insecticides. Ainsi, la mitomycine de *Streptomyces lavendulae* et les bléomycines de *Streptomyces verticillus* possèdent des propriétés anti-tumorales. Les rifamycines, produits de fermentation de *Streptomyces mediterranei*, ont montré des propriétés antivirales contre des bactériophages mais aussi des virus mammifères (Wehrli and Staehelin 1971). Par ailleurs, des agents immuno-suppresseurs tels que le FK-506 ou la rapamycine ont été isolés respectivement de *Streptomyces tsukubaensis* et *Streptomyces lygrosopicus*. L'acide clavulanique produit par *S. clavuligerus* est quant à lui un inhibiteur des pénicillines et est utilisé en association à la pénicilline dans le traitement des bactéries résistantes à la pénicilline. Enfin, les avermectines produites par *Streptomyces avermitilis* ont montré des propriétés insecticides et anti-parasitaires (Demain 1999).

Par ailleurs, les actinomycètes sont une très importante source d'enzymes. Ils sont notamment producteurs d'une des plus importantes enzymes industrielles, la glucose isomérase, utilisée pour la fabrication d'isoglucose (mélange glucose-fructose) (Bhosale *et al.* 1996). De plus, les actinomycètes ont la capacité de dégrader une grande variété de polymères comme les lignocelluloses (Adhi *et al.* 1989, Niladevi and Prema 2005) ou encore la chitine (Gomez *et al.* 2000) et ils possèdent ainsi toute une variété d'enzymes intervenant dans ces dégradations : des chitinases, des endo-glucanases, des peroxydases, des cellulases (Grigorevski de Lima *et al.* 2005) ou encore des xylanases et des estérases (Zimmermann *et*

al. 2006). Les actinomycètes produisent aussi de multiples protéases (Patke and Dey 2002, Vonothini *et al.* 2008) qui peuvent ensuite trouver des applications dans l'industrie alimentaire ou l'industrie des détergents (Oestergaard and Sjoeholm 2001, Moreira *et al.* 2002). En outre, les enzymes issues d'actinomycètes sont aussi utilisées dans les procédés de bioconversion. Ainsi, la fabrication d'acrylamide à partir d'acrylonitrile fait intervenir la nitrile hydratase de *Rhodococcus rhodochrous* J1 (Kobayashi *et al.* 1992). Enfin, de part leur capacité à dégrader de nombreux xénobiotiques comme les nitriles (Martinkova and Milerova 2003), les dioxines (Iida *et al.* 2009) ou encore les composés halogénés (Janssen *et al.* 2005), les actinomycètes suscitent l'intérêt pour leur usage dans la décontamination des sols pollués (Martinkova *et al.* 2008).

I.1.2. Une bactérie appartenant au genre *Saccharothrix*

I.1.2.1. Caractéristiques du genre *Saccharothrix*

Le genre *Saccharothrix* a été créé en 1984 par Labeda *et al.*. Il regroupe des souches d'actinomycètes qui ressemblent morphologiquement à celles du genre *Nocardiopsis* mais qui diffèrent par la composition chimique de leurs cellules. Les colonies portent en général un mycélium aérien qui s'avère plus ou moins abondant selon les souches. Les filaments du mycélium aérien se fragmentent de manière anarchique, souvent en « zig-zag » ce qui aboutit à la formation de longues chaînes de spores lisses, ovoïdes ou en bâtonnets et non motiles. Il n'y a pas de formation de sporophores comme chez les *Streptomyces*. Le mycélium de substrat se fragmente lui aussi, de manière plus ou moins importante en éléments souvent coccoïdes ou allongés (Bergey and Holt 1994). Le genre se distingue par son chimiotype, une paroi de type III (acide *méso*-diaminopimélique sans glycine), la présence de rhamnose, galactose et de mannose, une composition en phospholipides de type II ou IV, la présence d'une ménaquinone prédominante MK-9 (II₄) et l'absence d'acides mycoliques (Zitouni *et al.* 2004).

Le genre rassemble neuf espèces qui sont répertoriées dans le Tableau I-2. L'espèce *Saccharothrix tangerinus* (Kinoshita *et al.* 1999) a été récemment rattachée au nouveau genre *Umezawaea* et s'appelle donc désormais *Umezawaea tangerina* (Labeda and Kroppenstedt 2007).

Tableau I-2 Espèces appartenant au genre *Saccharothrix*

Espèces de <i>Saccharothrix</i>	N° d'accessibilité dans les collections	Référence
<i>Sa. algeriensis</i>	NRRL-B 24137	Zitouni <i>et al.</i> 2004
<i>Sa. australiensis</i>	ATCC 31497	Labeda <i>et al.</i> 1984
<i>Sa. coeruleofusca</i>	ATCC 35108	Grund and Kropenstedt 1989
<i>Sa. espanaensis</i>	ATCC 51144	Labeda and Lechevalier 1989
<i>Sa. longispora</i>	ATCC 35109	Grund and Kropenstedt 1989
<i>Sa. mutabilis</i> subsp. <i>capreolus</i>	ATCC 23892	Grund and Kropenstedt 1989
<i>Sa. mutabilis</i> subsp. <i>mutabilis</i>	ATCC 31520	Grund and Kropenstedt 1989
<i>Sa. syringae</i>	ATCC 51364	Grund and Kropenstedt 1989
<i>Sa. texasensis</i>	ATCC 51593	Labeda and Lyons 1989
<i>Sa. xinjiangensis</i>	NBRC 101911	Hu <i>et al.</i> 2004

I.1.3. Caractéristiques de l'espèce *Saccharothrix algeriensis*

I.1.3.1. Isolement et positionnement taxonomique

Sa. algeriensis NRRL B-24137 a été isolée à partir d'un échantillon de sol collecté dans la palmeraie d'Adrar (Sud de l'Algérie). L'isolement a été réalisé suivant la méthode des dilutions sur milieu vitamine B – humique - agar complété avec du sulfate de streptomycine ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) et de l'actidione ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

En premier lieu, une analyse chimiotaxonomique et morphologique de la souche isolée a permis de la classer au sein du genre *Saccharothrix*. Une analyse phylogénétique basée sur l'analyse de l'ARN 16S et sur le taux d'hybridation ADN-ADN a ensuite indiqué que la souche appartenait à une nouvelle espèce nommée *Sa. algeriensis* dont elle est la souche type (Lamari *et al.* 2002a, b, Zitouni *et al.* 2004). En effet, le pourcentage d'hybridation de 55,9% entre la souche isolée et la souche type de l'espèce la plus proche, *Sa. australiensis* NRRL 11239, s'avère inférieur à 70 %, pourcentage de délimitation des espèces (Wayne *et al.* 1987).

La souche a alors été déposée dans deux collections, l'« Agricultural Research Culture Collection » (ARCC) et la « Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen » (DSMZ) sous les numéros NRRL-B 24137 et DSM 44581 respectivement. La position taxonomique de *Sa. algeriensis* NRRL-B 24137 est indiquée dans le Tableau I-3.

Tableau I-3 Position taxonomique de *Saccharothrix algeriensis* NRRL-B 24137 (Euzéby [en ligne])

Niveau de classification	Position
Domaine	Bacteria
Phylum	Actinobacteria
Classe	Actinobacteria
Sous-classe	Actinobacteridae
Ordre	Actinomycetales
Sous-Ordre	Pseudonocardineae
Famille	Actinosynnemataceae
Genre	Saccharothrix
Espèce	Algeriensis

1.1.3.2. Caractéristiques morphologiques

Sa. algeriensis NRRL B-24137 est une bactérie aérobie qui forme un abondant mycélium aérien jaune orangé (sur milieu ISP 2, ISP 5 et milieu Bennett). Celui-ci se fragmente en spores en forme de bâtonnets et à la surface lisse, non motiles (Figure I-2).



Figure I-2 *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 vu au microscope électronique à balayage après croissance sur ISP2 pendant 10 jours à 30 °C (obtenue de Zitouni *et al.* 2004). La barre indique 2 µm. Fragmentation totale du mycélium aérien en de longues chaînes de spores.

Les sporophores, les sporanges, les synnemata et les sclérotes sont absents. La couleur du mycélium de substrat varie de jaune vif à jaune-marron suivant le milieu de culture utilisé. Il est ramifié et se fragmente peu ou pas en milieu liquide et solide. La croissance a lieu de 18 à 45 °C mais pas à 48 °C et de pH 5 à 9.

I.1.3.3. Spectre d'action de la souche

Sa. algeriensis NRRL B-24137 présente sur milieu ISP2 un large spectre d'action contre les bactéries à Gram positif, Gram négatif, les levures et les champignons filamenteux (Lamari 2006, Tableau I-4).

Tableau I-4 Activité antibiotique de *Sa. algeriensis* NRRL B-24137. L'activité a été déterminée par la méthode des stries croisées sur ISP2. L'intensité de l'activité antibiotique est fonction de la zone d'inhibition en mm : Pas de zone, -, Zone de 2 à 9 mm, +, de 10 à 19 mm, ++, de 20 à 32 mm, +++. D'après Lamari (2006).

Espèce cible	Activité antibiotique	Espèce cible	Activité antibiotique
Bactérie Gram +		Champignon filamenteux	
<i>Bacillus subtilis</i>	++	<i>Alternaria sp.</i>	++
<i>Micrococcus luteus</i>	+++	<i>Aspergillus niger</i>	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	<i>Bothrytis cinerera</i>	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	++
Bactérie Gram -		<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Ciceri</i>	+
<i>Alcaligenes faecalis</i>	+	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lentis</i>	+
<i>Escherichia coli</i>	++	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lini</i>	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+++	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	++
<i>Proteus mirabilis</i>	+	<i>Fusarium culmorum</i>	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<i>Fusarium graminearum</i>	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	<i>Geothrichum candidum</i>	++
<i>Serratia Marcescens</i>	+	<i>Mucor ramannianus</i>	+++
Levures		<i>Penicillium purpureum</i>	++
<i>Candida albicans</i>	+	<i>Penicillium sp.</i>	++
<i>Debaryomyces subglossus</i>	+	<i>Pithium irregulare</i>	++
<i>Kluyveromyces lactis</i>	+	<i>Rhizoctoria solani</i>	++
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	<i>Sclerotium sclerotiorum</i>	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	++	<i>Thielaviopsis neocaledoniae</i>	+++
		<i>Verticillium sp.</i>	++

L'activité antibiotique est globalement plus importante envers les bactéries à Gram positif (à l'exception d'*Enterococcus faecalis*) qu'envers celles à Gram négatif (à l'exception de *Klebsiella pneumoniae*). *Pseudomonas aeruginosa* est la seule bactérie testée montrant une absence totale de sensibilité à *Sa. algeriensis*. Enfin, l'activité antifongique de *Sa.*

algeriensis est particulièrement marquée notamment envers les champignons filamenteux phytopathogènes et toxigènes.

I.1.3.1. Caractérisation des antibiotiques produits sur milieu ISP2 enrichi en CaCO_3

Sept composés possédant une activité antibiotique contre *Bacillus subtilis* et *Mucor ramannianus* ont pu être purifiés à partir d'un surnageant de culture de *Sa. algeriensis* obtenu après cinq jours de culture sur milieu ISP2 liquide enrichi en CaCO_3 .

Six d'entre eux ont pu être caractérisés complètement. Leur structure est indiquée sur la Figure I-3B. Ils appartiennent à la famille des dithiopyrrolones dont la structure générale est montrée Figure I-3A (Lamari 2006).

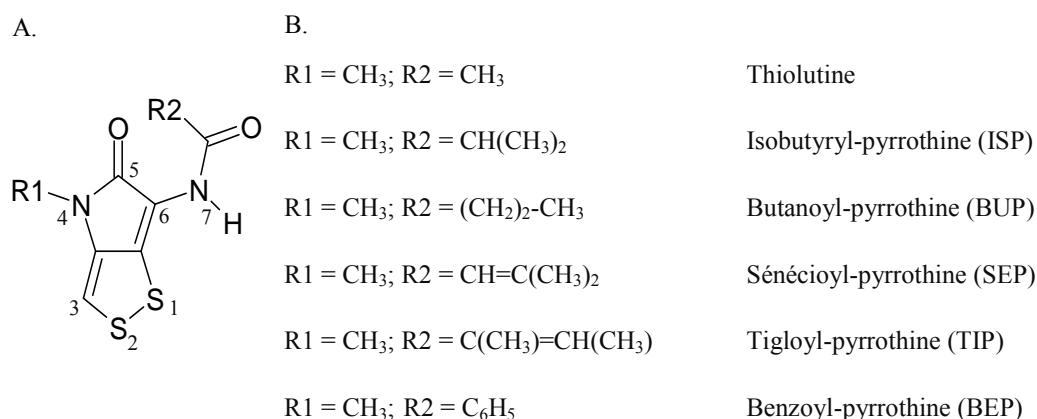


Figure I-3 A. Structure générale des dithiopyrrolones d'origines biologiques: le noyau pyrrolinonodithiole et ses radicaux R1 et R2. B. Dithiopyrrolones produites par *Sa. algeriensis* sur milieu ISP2 et complètement caractérisées. (Lamari 2006).

I.2. Les dithiopyrrolones

Les dithiopyrrolones regroupent des dérivés possédant un bi-hétérocycle 1,2-dithiolo-[4,3-b]-pyrrol-5(4H)-one, aussi appelé noyau pyrrolinonodithiole ou pyrrolinodithiole. Ce noyau bisulfide, stabilisé par une résonance marquée, est composé de deux cycles à 5 atomes : un cycle pyrrole et un cycle dithiole. Les composés dithiopyrrolones varient suivant la nature des radicaux portés par ce noyau.

Les dithiopyrrolones d'origines biologiques, dont la structure générale est présentée en Figure I-3A, peuvent être subdivisées en deux grandes familles selon la nature du groupement porté par l'azote N°4. Les « pyrrothines », dérivant du composé pyrrothine, (Figure I-4A) et les « holothines », dérivant du composé holothine, (Figure I-4B) portent respectivement un CH₃ et un H sur l'azote N°4.

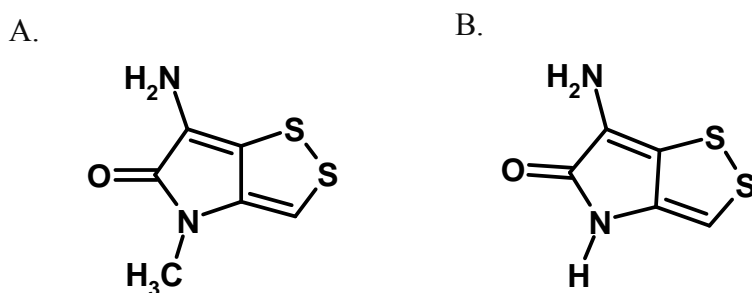


Figure I-4 Structure chimique des molécules pyrrothine (A.) et holothine (B.)

Cependant, la famille des dithiopyrrolones tend à s'étendre notamment grâce au progrès de la synthèse chimique de ces dérivés. Ainsi des composés dithiopyrrolones possédant un atome de soufre en position 7 (Guo *et al.* 2008), des radicaux portés par le C₃ ou une liaison ester à la place de la liaison amide (Stachel *et al.* 2002) ont été récemment décrits.

I.2.1. Sources biologiques

La première dithiopyrrolone a été isolée du milieu de culture de *Streptomyces albus* dès 1950 par Tanner *et al.* Depuis, un grand nombre de dithiopyrrolones a été isolé à partir de cultures bactériennes (Tableau I-5).

Tableau I-5 Dithiopyrrolones d'origines microbiennes et organismes producteurs d'après Bouras (2005)

Antibiotique	Formule et PM	R1	R2	Espèces productrices	Références
Formoyl-pyrrothine	C ₇ H ₆ N ₂ O ₂ S ₂ PM=214	CH ₃	NH-CO-H	<i>Saccharothrix algeriensis</i>	Bouras <i>et al.</i> 2008
Thiolutine (<i>syn.</i> : acétyl-pyrrothine, acéto-pyrrothine, farcinicine)	C ₈ H ₈ N ₂ O ₂ S ₂ PM=228	CH ₃	NH-CO-CH ₃	<i>Streptomyces thioluteus</i> , <i>S. celluloflavus</i> , <i>S. albus</i> , <i>S. pimprina</i> , <i>S. kasugaensis</i> , <i>S. luteoreticuli</i> , <i>Saccharothrix algeriensis</i>	Celmer and Solomons 1955, Yamagishi <i>et al.</i> 1971, Furumai <i>et al.</i> 1982, Lamari <i>et al.</i> 2002a,b
Auréothricine (<i>syn.</i> : propionyl-pyrrothine, propio-pyrrothine)	C ₉ H ₁₀ N ₂ O ₂ S ₂ PM=242	CH ₃	NH-CO-CH ₂ -CH ₃	<i>Streptomyces kasugaensis</i> , <i>S. pimprina</i> , <i>S. farcinus</i> , <i>S. thioluteus</i> , <i>S. luteoreticuli</i> , <i>S. celluloflavus</i> , <i>S. cyanoflavus</i>	Umezawa <i>et al.</i> 1949, Celmer <i>et al.</i> 1952, Nishimura <i>et al.</i> 1953, Celmer and Solomons 1955, Funaki <i>et al.</i> 1958, Yamagishi <i>et al.</i> 1971, Furumai <i>et al.</i> 1982, Bhate <i>et al.</i> 1960
<i>Iso</i> -butyryl-pyrrothine (<i>syn.</i> : <i>Iso</i> -butyro-pyrrothine, 2-méthyl-propanoyl-pyrrothine)	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₂ S ₂ PM=256	CH ₃	NH-CO-CH-(CH ₃) ₂	<i>Streptomyces pimprina</i> , <i>Saccharothrix algeriensis</i>	Bhate <i>et al.</i> 1960, Lamari <i>et al.</i> 2002a,b
Xénorhabdine VII (<i>syn.</i> : butanoyl-pyrrothine, butyro-pyrrothine)	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₂ S ₂ PM=256	CH ₃	NH-CO-(CH ₂) ₂ -CH ₃	<i>Xenorhabdus bovienii</i> , <i>Saccharothrix algeriensis</i>	Li <i>et al.</i> 1995, Lamari <i>et al.</i> 2002a,b
Sénécioyl-pyrrothine (<i>syn.</i> : 3-méthyl-2-butenoyl-pyrrothine)	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ S ₂ PM=268	CH ₃	NH-CO-CH=C(CH ₃) ₂	<i>Saccharothrix algeriensis</i>	Lamari <i>et al.</i> 2002a,b
Tigloyl-pyrrothine	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ S ₂ PM=268	CH ₃	NH-CO-C(CH ₃)=CH(CH ₃)	<i>Saccharothrix algeriensis</i>	Lamari <i>et al.</i> 2002a,b
Valéryl-pyrrothine (<i>syn.</i> : pentanoyl-pyrrothine)	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₂ S ₂ PM=270	CH ₃	NH-CO-(CH ₂) ₃ -CH ₃	<i>Saccharothrix algeriensis</i>	Bouras <i>et al.</i> 2008
Benzoyl-pyrrothine	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₂ S ₂ PM=290	CH ₃	NH-CO-C ₆ H ₅	<i>Saccharothrix algeriensis</i>	Bouras <i>et al.</i> 2008
Xénorhabdine VI (<i>syn.</i> : 3-méthyl-butanoyl-pyrrothine)	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₂ S ₂ PM=270	CH ₃	NH-CO-CH ₂ -CH-(CH ₃) ₂	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	Li <i>et al.</i> 1995
Xénorhabdine IV (<i>syn.</i> : hexanoyl-pyrrothine)	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₂ S ₂ PM=284	CH ₃	NH-CO-(CH ₂) ₄ -CH ₃	<i>Xenorhabdus bovienii</i> , <i>Xenorhabdus</i> sp. Q1, <i>Xenorhabdus nematophilus</i>	Mc Inerney <i>et al.</i> 1991, Li <i>et al.</i> 1995, Paik <i>et al.</i> 2001
Xénorhabdine V (<i>syn.</i> : 5-méthyl-hexanoyl-pyrrothine)	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₂ S ₂ PM=298	CH ₃	NH-CO-(CH ₂) ₃ -CH-(CH ₃) ₂	<i>Xenorhabdus bovienii</i> , <i>Xenorhabdus nematophilus</i>	Mc Inerney <i>et al.</i> 1991, Li <i>et al.</i> 1995, Paik <i>et al.</i> 2001

Antibiotique	Formule et PM	R1	R2	Espèces productrices	Références
Holomycine (syn.: déméthyl-thiolutine)	C ₇ H ₆ N ₂ O ₂ S ₂ PM=214	H	NH-CO-CH ₃	<i>Streptomyces clavuligerus</i> , <i>Streptomyces</i> sp. P6621, <i>Streptomyces griseus</i>	Okamura <i>et al.</i> 1977, Kenig and Reading 1979, Gaeumann <i>et al.</i> 1961
Propionyl-holothine	C ₈ H ₈ N ₂ O ₂ S ₂ PM=228	H	NH-CO-CH ₂ -CH ₃	<i>Streptomyces</i> sp. P6621	Okamura <i>et al.</i> 1977
Xénorhabdine I (syn.: hexanoyl-holothine)	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₂ S ₂ PM=270	H	NH-CO-(CH ₂) ₄ -CH ₃	<i>Xenorhabdus bovienii</i> , <i>Xenorhabdus</i> sp. Q1	Mc Inerney <i>et al.</i> 1991
Xanthidrol (dérivé de la Xénorhabdine I)	C ₂₄ H ₂₂ N ₂ O ₃ S ₂ PM=450	Xanthidryl	NH-CO-(CH ₂) ₄ -CH ₃	Transformation chimique de la xénorhabdine I	Mc Inerney <i>et al.</i> 1991
Xénorhabdine II (syn.: 5-méthyl-hexanoyl-holothine)	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₂ S ₂ PM=270	H	NH-CO-(CH ₂) ₃ -CH-(CH ₃) ₂	<i>Xenorhabdus bovienii</i> , <i>Xenorhabdus</i> sp. Q1, <i>Xenorhabdus nematophilus</i>	Mc Inerney <i>et al.</i> 1991, Paik <i>et al.</i> 2001
Xénorhabdine III (syn.: octanoyl-pyrrothine)	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₂ S ₂ PM=298	H	NH-CO-(CH ₂) ₆ -CH ₃	<i>Xenorhabdus bovienii</i> , <i>Xenorhabdus</i> sp. Q1	Mc Inerney <i>et al.</i> 1991
Déméthyl-benzoyl-pyrrothine (syn. : benzoyl-holothine)	C ₁₂ H ₈ N ₂ O ₂ S ₂ PM=298	H	NH-CO-C ₆ H ₅	<i>Saccharothrix algeriensis</i>	Bouras <i>et al.</i> 2008
Thioaurine (syn.: orosomycine ou antibiotique vD 844)	C ₇ H ₆ N ₂ O ₂ S ₂ PM=214	H	CH ₃ -N-CHO	<i>Streptomyces</i> sp.	Von Daehne <i>et al.</i> 1969
vD 846	C ₆ H ₄ N ₂ O ₂ S ₂ PM=200	H	NH-CHO	<i>Streptomyces</i> sp.	Von Daehne <i>et al.</i> 1969
Thiomarinole A	C ₃₀ H ₄₄ N ₂ O ₉ S ₂ PM=640	H	NH-CO-C ₂₅ H ₄₀ O ₇	<i>Alteromonas rava</i>	Shiozawa <i>et al.</i> 1993
Thiomarinole B	C ₃₀ H ₄₄ N ₂ O ₁₁ S ₂ PM=672	H	NH-CO-C ₂₅ H ₄₀ O ₉	<i>Alteromonas rava</i>	Shiozawa <i>et al.</i> 1995
Thiomarinole C	C ₃₀ H ₄₄ N ₂ O ₈ S ₂ PM=624	H	NH-CO-C ₂₅ H ₄₀ O ₆	<i>Alteromonas rava</i>	Shiozawa <i>et al.</i> 1995
Thiomarinole D	C ₃₁ H ₄₆ N ₂ O ₉ S ₂ PM=654	H	NH-CO-C ₂₆ H ₄₂ O ₇	<i>Alteromonas rava</i>	Shiozawa <i>et al.</i> 1997
Thiomarinole E	C ₃₂ H ₄₈ N ₂ O ₉ S ₂ PM=668	H	NH-CO-C ₂₇ H ₄₄ O ₇	<i>Alteromonas rava</i>	Shiozawa <i>et al.</i> 1997
Thiomarinole F	C ₃₀ H ₄₂ N ₂ O ₉ S ₂ PM=638	H	NH-CO-C ₂₅ H ₃₈ O ₇	<i>Alteromonas rava</i>	Shiozawa <i>et al.</i> 1997
Thiomarinole G	C ₃₀ H ₄₄ N ₂ O ₈ S ₂ PM=624	H	NH-CO-C ₂₅ H ₄₀ O ₆	<i>Alteromonas rava</i>	Shiozawa <i>et al.</i> 1997

Différentes espèces de *Streptomyces* se sont montrées capables de produire la thiolutine mais aussi différents dérivés tels que l'auréothricine, l'isobutyryl-pyrrothine, l'holomycine ou encore la propionyl-holothine. Certaines bactéries non mycéliennes se sont aussi avérées être productrices de dithiolopyrrolones. Ainsi, le genre *Xenorhabdus* regroupe des bactéries symbiotiquement associées à des nématodes et productrices de dithiolopyrrolones aux structures variées aussi appelées xénorhabdines. Enfin, la bactérie marine *Alteromonas rava* produit des composés dithiolopyrrolones très complexes dérivant de l'holothine et de l'acide pseudomonique, les thiomarinoles.

I.2.1. Voie de biosynthèse

La voie de biosynthèse des dithiolopyrrolones n'est pas encore élucidée et aucune enzyme intervenant n'a encore été purifiée. Cependant les études de Furumai *et al.* (1982) sur la production d'auréothricine par *Streptomyces kasugaensis* permettent d'établir une voie de biosynthèse potentielle décrite Figure I-5. La cystine serait le précurseur du noyau pyrrothine. Ensuite, la formation d'une liaison amide entre la pyrrothine et un acide organique activé sous forme d'acyl-CoA entraînerait la formation d'une dithiolopyrrolone. L'existence d'une activité enzymatique catalysant l'acylation de l'holothine avec de l'acétyl-CoA a par ailleurs été mise en évidence par De La Fuente *et al.* (2002) dans des extraits cellulaires de mutants de *S. clavuligerus* producteurs d'holomycine. Cependant l'enzyme responsable de cette activité n'a pas été encore purifiée.

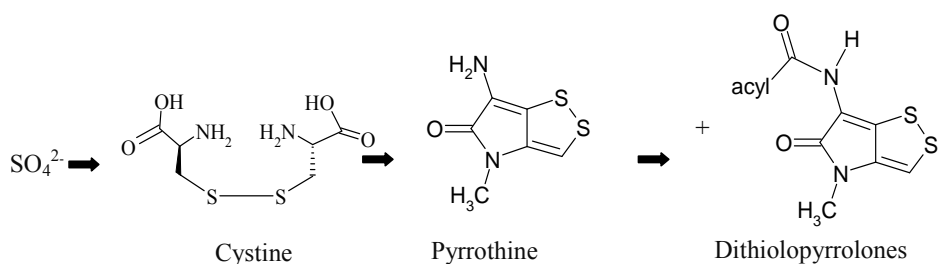


Figure I-5 Voie de biosynthèse potentielle des dithiolopyrrolones. D'après Furumai *et al.* 1982

I.2.2. Synthèse chimique

La thiolutine, l'auréothricine et l'holomycine ont été synthétisées totalement par voie chimique dès 1962 par Schmidt et Geiger. Puis différentes approches ont été utilisées pour la synthèse chimique totale des dithiolopyrrolones par Büchi and Lukas (1964), Hagio and

Yoneda (1974) ou encore Ellis *et al.* (1977) mais les voies de synthèse utilisées restaient complexes (7 étapes au moins). Des voies de synthèse simplifiées permettant par ailleurs de multiplier les composés synthétisés ont été rapportées plus récemment (Hjelmgaard *et al.* 2007, Li *et al.* 2007). Les travaux de Hjelmgaard *et al.* (2007) fournissent ainsi une voie de synthèse en six étapes permettant de synthétiser différentes dithiolopyrrolones (R1= H, R2 variable) grâce à l'acylation de l'intermédiaire holothine à l'aide de chlorures d'acyle. La voie de synthèse en six étapes de Li *et al.* (2007) permet quant à elle de diversifier à la fois les radicaux R1 et R2 fixés sur le noyau pyrrolinonodithiole mais nécessite l'usage de l'acétate de mercure, composé à la fois toxique et polluant.

I.2.3. Propriété physico-chimiques et spectroscopiques

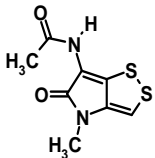
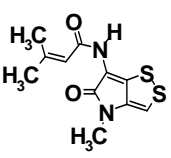
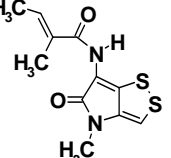
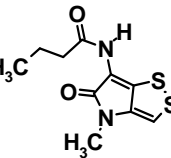
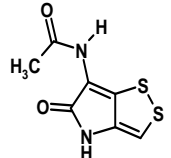
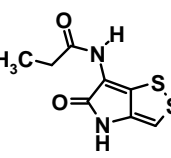
L'ensemble des dithiolopyrrolones possède des propriétés physico-chimiques et spectroscopiques caractéristiques (Tableau I-6).

Les spectres UV montrent deux maxima d'absorption caractéristiques à une longueur d'onde comprise entre 302 et 311 nm d'une part et entre 388 et 402 nm d'autre part. Ces maxima d'absorption sont caractéristiques du noyau pyrrolinonodithiole qui confère leur couleur jaune aux dithiolopyrrolones.

Leurs spectres infrarouges font apparaître plusieurs maxima d'absorption correspondants aux différents groupes fonctionnels des dithiolopyrrolones c'est à dire deux liaisons amides et deux liaisons C=C. Un premier maximum d'absorption entre 1530-1553 cm^{-1} correspond à une vibration en déformation des liaisons NH. Un deuxième maximum d'absorption entre 3205-3280 cm^{-1} correspond à la vibration en élongation des liaisons NH. Deux bandes C=O sont visibles entre 1633-1661 cm^{-1} et 1645-1680 cm^{-1} . Par ailleurs une bande entre 1575-1600 cm^{-1} traduit la présence de liaisons C=C.

Enfin les spectres de masse des dithiolopyrrolones obtenus par impact électronique présentent un pic caractéristique $m/z=172$ ou 186 correspondant à la molécule après la perte du groupement acyl lié par une liaison amide à l'azote N°7. Ce fragment caractéristique correspond à la pyrrothine ($m/z=186$) ou à l'holothine ($m/z=172$) suivant la dithiolopyrrolone considérée.

Tableau I-6 Données physico-chimiques et spectroscopiques de quelques dithiopyrrolones d'après Celmer and Solomons (1955), Okamura *et al.* (1977), Lamari *et al.* 2002, le Merck index.

	Thiolutine	Senecioid-pyrrothine	Tigloyl-pyrrothine	Butanoyl-pyrrothine	Holomycine	Propionyl-holothine
Couleur	Jaune	Jaune-Orange	Jaune-Orange	Jaune-Orange	Jaune-Orange	Jaune-Orange
Formule chimique	C ₈ H ₈ N ₂ O ₂ S ₂	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ S ₂	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ S ₂	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₂ S ₂	C ₇ H ₆ N ₂ O ₂ S ₂	C ₈ H ₈ N ₂ O ₂ S ₂
Structure						
Solubilité						
Soluble	MeOH, EtOH, CHCl ₃ , acétone, CH ₃ COOH glacial, MIBC, DMSO	MeOH, CH ₂ Cl ₂ , CHCl ₃ , DMSO	MeOH, CH ₂ Cl ₂ , CHCl ₃ , DMSO	MeOH, CH ₂ Cl ₂ , CHCl ₃ , DMSO		
Légèrement soluble	H ₂ O	Me ₂ CO, H ₂ O, EtOAc, CH ₃ CN	Me ₂ CO, H ₂ O, EtOAc, CH ₃ CN	Me ₂ CO, H ₂ O, EtOAc, CH ₃ CN		
Peu soluble	Ether, benzène, hexane					
Insoluble		Hexane	Hexane	Hexane		
UV dans le MeOH : λ max en nm (log ε)	250 (3,80), 311 (3,75), 388 (4,04)	302 (3,87), 402 (3,97)	302 (3,85), 402 (3,96)	308 (3,70), 389 (3,92)	246 (3,81), 302 (3,49), 388 (4,05)	246 (3,89), 302 (3,63), 388 (4,16)
IR dans le KBr : ν max en cm⁻¹	1550, 1600, 1633, 1666, 3205	1225, 1520, 1600, 1635, 1655, 1680, 3270	1210, 1500, 1600, 1650, 1670, 3220	1225, 1540, 1600, 1650, 1680, 3280	1553, 1600, 1639, 1661, 3225	1530, 1575, 1630, 1645, 3100
EI-MS (m/z)		268 (M ⁺), 186, 83, 55	268 (M ⁺), 186, 83, 55	256 (M ⁺), 186, 43	214 (M ⁺), 172, 43	228 (M ⁺), 172, 57
RMN ¹H (δ en ppm, multiplicité, constante de couplage en Hz)						
H-3	7,30 (1H, s)	6,62 (1H, s)	6,63 (1H, s)	6,65 (1H, s)	7,05 (1H, s)	
N(4)-CH3	3,20 (3H, s)	3,37 (3H, s)	3,37 (3H, s)	3,37 (3H, s)		
N(4)-H					9,86 (1H, s)	
C(6)-NH	9,95 (1H, s large)	7,43 (1H, s large)	7,69 (1H, s large)	7,45 (1H, s large)	10,68 (1H, s)	
Groupe acyl	2,5 (3H, s)	5,71 (1H, m), 2,25 (3H, d, 1)	6,65 (1H, m), 1,92 (3H, s large), 1,83 (3H, d, 8)	2,33 (2H, t, 7), 1,74 (2H, sxt, 7), 1,00 (3H, t, 7)	2,03 (3H, s)	

I.2.4. Activités biologiques

I.2.4.1. Activité antimicrobienne

Les dithiopyrrolones possèdent une activité antimicrobienne à large spectre d'action contre les bactéries à Gram positif, les levures et moisissures, les protozoaires et dans une moindre mesure contre les bactéries à Gram négatif (Gaeumann *et al.* 1961, Otoguro *et al.* 1988, Mc Inerney *et al.* 1991, Oliva *et al.* 2001, Lamari *et al.* 2002, Lamari 2006, Tableau I-7).

Tableau I-7 Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des dithiopyrrolones de *Sa. algeriensis* obtenues sur 20 germes cibles, issu de Lamari 2006.

Microorganismes tests	CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
	Thiolutine	SEP	TIP	ISP	BUP
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	2	1	4	20	5
<i>Bacillus coagulans</i> CIP 6625	<0,2	<0,2	0,5	3	1
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9314	<0,2	1	1	<0,2	2
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 7625	20	50	40	75	40
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CIP 82.91	1	1	5	5	1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Salmonella enterica</i> CIP 81.3	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A22	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas syringae</i> n° 1882	100	>100	>100	100	100
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> n° 2410	100	>100	>100	100	100
<i>Mucor ramannianus</i> NRRL 1829	10	2	4	5	5
<i>Penicillium</i> sp.	20	20	10	30	20
<i>Alternaria</i> sp.	20	20	5	20	20
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Albedinis</i>	30	20	20	30	20
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i> Fohn 3-5	40	20	20	40	40
<i>Fusarium equiseti</i>	10	10	20	20	10
<i>Fusarium culmorum</i>	10	4	5	20	10
<i>Fusarium graminearum</i>	10	4	10	10	10
<i>Candida albicans</i> IPA 200	20	20	20	30	20
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	10	2	2	10	3

Le spectre d'action des composés dithiopyrrolones dépend cependant de la nature des radicaux variables. Ainsi l'holomycine ne semble pas posséder d'activité antifongique, en particulier contre *Saccharomyces cerevisiae*, contrairement à la thiolutine, l'ISP, la BUP, la SEP et la TIP (CMI comprise entre 2 et 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). L'holomycine semble par contre présenter une meilleure activité contre les bactéries à Gram négatif, en particulier *Escherichia*

coli peu sensible aux pyrrothines isolées chez *Sa. algeriensis* : la thiolutine, TIP, SEP, BUP et ISP (Oliva *et al.* 2001, Lamari *et al.* 2002). Au sein des pyrrothines ($R_1=CH_3$, R_2 variables) les activités antimicrobiennes et en particulier antifongiques s'avèrent aussi variables. Ainsi, l'activité antifongique contre *Sa. cerevisiae*, *Mu. ramanianus*, ou encore *Fusarium culmorum* s'avère plus importante pour la SEP et la TIP que pour la thiolutine (CMI 2 à 5 fois plus faibles) (Lamari *et al.* 2002). De la même manière, la butyryl-holothine semble présenter une activité antibiotique contre *Corynebacterium diphtheriae* bien plus importante que l'holomycine (CMI 10 fois plus faible) (Gaeumann *et al.* 1961).

1.2.4.2. Autres activités

Cependant, le spectre d'action des dithiopyrrolones ne se limite pas aux microorganismes. Ainsi les xénorhabdines ont aussi montré des propriétés larvicides (Cole and Rolinson 1972) et insecticides (Mc Inerney *et al.* 1991).

Depuis les années 1990, l'activité anticancéreuse des dithiopyrrolones a aussi été mise en évidence. Minamigushi *et al.* (2001) ont rapporté la capacité de la thiolutine à inhiber l'adhésion de certaines cellules endothéliales (Human Umbilical Veins Endothelial Cells) à la vitronectine. Ainsi, la thiolutine supprime l'angiogénie induite par les tumeurs *in vivo* ce qui lui confère une activité antitumorale. Par ailleurs de nombreuses dithiopyrrolones sont cytotoxiques pour certaines lignées cellulaires cancéreuses, en particulier les cellules cancéreuses du colon, du cerveau et du sein (Webster *et al.* 2000). En outre, les activités anticancéreuses comme les activités antimicrobiennes s'avèrent dépendantes de la nature des radicaux variables. Li *et al.* (2007) ont ainsi montré que la présence d'un groupement aromatique sur l'azote du noyau pyrrolone (N°4) et sur la liaison amide exocyclique entraîne une cytotoxicité accrue contre les cellules cancéreuses du sein, du foie et des poumons. De tels composés dithiopyrrolones ont été synthétisés et montrent des activités anticancéreuses prometteuses à la fois *in vitro* et *in vivo*.

De plus, les dithiopyrrolones inhibent les allergies (Stahl *et al.* 1988) et l'agrégation des plaquettes (Ninomiya *et al.* 1980). Enfin, il a été rapporté que les dithiopyrrolones ont la capacité de stimuler la production de globules blancs (Guo *et al.* 2008, Guoping and Qunhai 2009). Ces composés pourraient donc être utilisés pour la prévention et le traitement des infections associées au VIH et des maladies sanguines ou comme médicaments auxiliaires pour limiter la décroissance des globules blancs lors des radiothérapies et chimiothérapies.

I.2.5. Toxicité

La DL₅₀ de la thiolutine est de 25 mg kg⁻¹ chez la souris quelle que soit la voie d'administration, voie orale, sous-cutanée ou intraveineuse (Seneca *et al.* 1952) ce qui entraîne sa classification parmi les composés très toxiques (T+) (Maison 2006).

I.2.6. Mode d'action antimicrobien

Bien que les dithiopyrrolones et leurs propriétés antimicrobiennes aient été découvertes il y a plus de 50 ans, assez peu de choses sont connues sur leur mode d'action.

Les études menées sur la thiolutine et l'holomycine suggèrent que les dithiopyrrolones sont des inhibiteurs des ARN polymérases ADN dépendantes. La thiolutine inhibe la synthèse d'ARN à la fois chez *E. coli* (Khachatourians and Tipper 1974a) et *Sa. cerevisiae* (Jimenez *et al.* 1973) et est décrite comme un inhibiteur des ARN polymérases partiellement purifiées de *Sa. cerevisiae in vitro* (Tipper 1973). Les études menées sur le mode d'action de la thiolutine et de l'holomycine chez *E. coli* semblent par ailleurs montrer que la synthèse d'ARN est inhibée au niveau de l'étape d'élongation (Khachatourians and Tipper 1974b, Oliva *et al.* 2001). Cependant, l'ARN polymérase d'*E.coli* n'est pas inhibée *in vitro* par la thiolutine et l'holomycine (Sivasubramanian and Javaraman 1976, Oliva *et al.* 2001). Ces résultats suggèrent que la thiolutine et l'holomycine pourraient être, chez *E.coli*, des « prodrugs », c'est-à-dire des molécules qui sont transformées au sein de la cellule en molécules actives qui sont elles directement inhibitrices de l'ARN polymérase (Oliva *et al.* 2001). Par ailleurs, d'autres modes d'action de la thiolutine ont été rapportés. La thiolutine pourrait inhiber aussi la traduction (Tipper and Jimenez 1973). Elle amplifie les réponses aux stress (Adams and Gross 1991, Grigull *et al.* 2004), affecte les systèmes de transport (Joshi *et al.* 1982, Bergman 1988) et bloque la dégradation des ARN messagers chez la levure (Pelechano and Perez-Ortin 2008).

I.2.7. Applications

L'usage des dithiopyrrolones comme agents anti-infectieux dans le domaine médical semble limité par leur toxicité. Cependant, l'activité antimicrobienne des dithiopyrrolones pourrait potentiellement être exploitée dans le domaine de la protection des cultures agricoles.

La thiolutine a en effet montré dans ce domaine des effets prometteurs. A 10 ppm, la thiolutine protège la tomate contre la fusariose vasculaire due à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* et n'affecte pas sa croissance (Gopalkrishnan and Jump 1952). Par ailleurs la thiolutine a montré une activité contre de nombreux phytopathogènes tels que la moisissure noire (*Botryosphaeria obtusa*), le feu bactérien de la pomme (*Erwinia amylovora*) ou la moisissure bleue du tabac (*Peronospora tabacina*). En outre, Godfrey et Dell (1986) ont breveté pour le compte de la société Zeneca Agrochemicals (anciennement Imperial Chemical Industry), la voie de synthèse d'une cinquantaine de dérivés dithiolopyrrolones possédant des activités antifongiques contre des phytopathogènes majeurs tels que le mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) et de la tomate (*Phytophthora infestans*) ou encore la fonte des semis de la pomme de terre (*Pithium ultimum*). Un des meilleurs composés a montré une activité protectrice contre *Plasmopara viticola* à une concentration de seulement 3 ppm. Malheureusement les dérivés synthétisés ont montré surtout une activité protectrice et peu de mobilité dans la plante. Ainsi, malgré des activités antifongiques intéressantes l'intérêt de ces molécules n'a pas été jugé suffisant pour continuer leur étude (Godfrey 1994). Malgré tout, l'existence de ces travaux démontre l'intérêt des industriels pour l'usage des dithiolopyrrolones dans le domaine agricole.

Enfin les dithiolopyrrolones suscitent de nouveau l'intérêt dans le domaine médical notamment pour leur activité anticancéreuse (trois brevets) et leur capacité à stimuler la production des globules blancs (deux brevets).

I.3. Mécanismes de régulation de la production d'antibiotiques chez les actinomycètes

Le niveau de production des métabolites secondaires, notamment chez les actinomycètes, dépend à la fois de la quantité de précurseurs disponible et du niveau d'activité des enzymes de la voie de biosynthèse. Ces deux leviers de régulation du métabolisme secondaire sont influencés par de nombreux paramètres, entre autres nutritionnels et physico-chimiques et sont contrôlés par des mécanismes de régulation particuliers.

Cette étude bibliographique s'appliquera plus particulièrement à décrire l'effet de ces paramètres et mécanismes sur l'activité des enzymes de biosynthèse. L'influence des sources nutritionnelles puis celle du taux de croissance sera détaillée. Enfin un état de l'art concernant les mécanismes d'induction des enzymes du métabolisme secondaire sera rapporté.

I.3.1. Influence des sources nutritionnelles

Les différentes composantes du milieu de culture ont montré une grande influence sur la production de métabolites secondaires, entre autres chez les actinomycètes. Parmi les sources nutritionnelles, les sources de carbone, d'azote et de phosphate affectent fortement cette production. L'épuisement de ces sources nutritionnelles pourrait déclencher l'initiation de la synthèse d'antibiotique en permettant de lever la régulation négative exercée par ces nutriments (Martin and Demain 1980).

I.3.1.1. Source de carbone

- **Une influence négative des sources de carbone rapidement métabolisées sur la production de métabolites secondaires**

Tableau I-8 Diminution de la production d'antibiotiques chez les actinomycètes par les sources de carbone rapidement assimilables.

Famille chimique	Antibiotique	Producteurs	Source de carbone ayant un effet négatif sur la production d'antibiotiques	Référence
Polypeptides	Actinomycines	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Glucose	Gallo and Katz 1972
β-lactames	Céphamycine C	<i>Streptomyces lactamadurans</i>	Glucose	Cortes <i>et al.</i> 1986
		<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Glycérol	Lebrihi <i>et al.</i> 1988a
Aminoglycosides	Gentamycine	<i>Micromonospora purpurea</i>	Glucose, Xylose	Escalante <i>et al.</i> 1992
	Kanamycine	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Glucose, Glycérol	Basak and Majumdar 1973
Macrolides	Oléandomycine	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Glucose	Asinovskaia <i>et al.</i> 1985
	Tylosine	<i>Streptomyces fradiae</i>	Glucose	Vu-Trong <i>et al.</i> 1980
	Spiramycine	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Glycérol	Lounès <i>et al.</i> 1995a
		<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Glucose	Lounès <i>et al.</i> 1996a
Nucléosides	Puromycine	<i>Streptomyces alboniger</i>	Glucose	Sankaran and Pogell 1975
Anthracyclines	Rétamycine	<i>Streptomyces olindensis</i>	Glucose	Inoue <i>et al.</i> 2007

La production spécifique de métabolites secondaires s'avère souvent meilleure sur une source de carbone complexe, plus difficilement métabolisable comme les polysaccharides (amidon, dextrines) (Lebrihi *et al.* 1988a, Lounès *et al.* 1995a), les oligosaccharides (fructose,

galactose, lactose) (Basak and Majumdar 1973) ou les huiles (méthyloléate, huile de soja) (Park *et al.* 1994), que sur une source de carbone rapidement assimilable telle que le glucose ou le glycérol. En effet, même s'il supporte bien la croissance bactérienne, le glucose, comme d'autres sources de carbone rapidement métabolisées, entraîne une diminution drastique de la biosynthèse de nombreux métabolites secondaires (Tableau I-8). Par exemple, l'ajout de 165 mM (29,7 g L⁻¹) de glucose au milieu de culture de *S. lactamadurans* supprime complètement la production de céphamycine (Cortès *et al.* 1986).

Dans plusieurs cas, le mécanisme de cette régulation par la source de carbone a été examiné. Certaines enzymes sujettes à une répression par les sources de carbone rapidement assimilables ont notamment pu être mises en évidence.

- Action de la source de carbone sur les enzymes du métabolisme secondaire

Il s'agit d'abord d'enzymes intervenant dans la voie de biosynthèse des métabolites secondaires. Ainsi, la formation de la phénoxazone synthase, impliquée dans la biosynthèse de l'actinomycine, s'est avérée réprimée par le glucose lorsqu'il est ajouté à une concentration aussi faible que 0,1 % (5,55 mM) (Gallo and Katz 1972). La biosynthèse de l'O-déméthylpuromycine méthylase catalysant la dernière étape dans la formation de la puromycine chez *S. alboniger* (Sankaran and Pogell 1975) est supprimée par l'ajout, au milieu Hickey-Tresner, de glucose à 1 % (55,5 mM). Par ailleurs, l'expression de la céphamycine C synthétase et de l'expandase chez *S. clavuligerus* est plus faible lorsque le glycérol est utilisé comme source de carbone à 10 g L⁻¹ que lorsque l'amidon est utilisé à la même concentration (Lebrihi *et al.* 1988a). Enfin, une augmentation de la concentration en glucose initiale de 55 à 165 mM entraîne la répression de l'expandase chez *S. lactamadurans* (Cortès *et al.* 1986).

Une inhibition directe des enzymes du métabolisme secondaire (et non une répression de leur biosynthèse) peut aussi entrer en jeu dans le contrôle par la source de carbone. Les enzymes de biosynthèse de la céphamycine C sont ainsi inhibées par les catabolites phosphorylés du glucose lorsqu'ils sont ajoutés dans le test d'activité à 1 mM (Lebrihi *et al.* 1988a, Cortès *et al.* 1986). En outre, le glycérol et certains métabolites dérivés inhibent la D-cyclosérine synthétase chez *Streptomyces garyphalus* à une concentration de 4 mM (Svensson *et al.* 1983).

- Action de la source de carbone sur les enzymes intervenant dans la synthèse des précurseurs

Les enzymes cibles de la répression catabolique par le glucose peuvent aussi être des enzymes intervenant dans la synthèse des précurseurs. Ainsi, chez *S. ambofaciens*, la valine deshydrogénase et l' α -kétoisovalérate deshydrogénase intervenant dans la formation des précurseurs de la spiramycine sont réprimées par l'ajout de glycérol à 60 g L⁻¹ (0,65 mM) (Lounès *et al.* 1995). Par ailleurs, la formation des précurseurs d'un autre macrolide, la tylosine, semble être affectée par l'ajout de glucose à 30 g L⁻¹ (166 mM), notamment par répression de la méthylmalonyl-CoA carboxyltransférase (Vu-Trong *et al.* 1980, Choi *et al.* 1998) chez *S. fradiae*.

- Rôle potentiel de l'AMPc dans la régulation par la source de carbone

Un nucléotide phosphorylé, l'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPc) pourrait être impliqué dans la répression du métabolisme secondaire par le glucose chez les actinomycètes, suivant un mécanisme analogue à celui observé chez les bactéries entériques.

Chez les bactéries entériques, l'AMPc joue un rôle dans la répression catabolique par le glucose. L'AMPc intervient dans la régulation de plusieurs opérons regroupant des gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des autres sources de carbone (l'opéron lactose par exemple). Dans le cas de ces opérons, la liaison du complexe AMPc – protéine réceptrice sur un promoteur favorise l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase. Or, le glucose inhibe l'adényl-cyclase qui catalyse la conversion de l'ATP en AMPc et entraîne la baisse de la concentration intracellulaire en AMPc. Par conséquent, lorsque la concentration en glucose est élevée, la concentration en AMPc est faible et la transcription de ces opérons est inhibée. Lorsque la concentration en glucose baisse, la concentration en AMPc augmente et la transcription de ces opérons est activée.

Quelques résultats vont dans le sens d'un rôle similaire de l'AMPc chez les actinomycètes dans la répression du métabolisme secondaire par le glucose. Satoh *et al.* (1976) rapportent ainsi que l'AMPc supprime la répression par le glucose de l'acétylkanamycine amidohydrolase (kanamycine synthétase) chez *S. kanamyceticus*. Par ailleurs, un mutant de *S. fradiae* producteur de tylosine contient 20 à 50 % de plus d'AMPc que la souche parentale. Lors de la croissance de ce mutant, l'ajout de chloroquinine qui stimule l'adénylate cyclase, entraîne une hausse de la concentration en AMPc et de la production de tylosine (Colombo *et al.* 1982). Cependant de nombreuses observations

indiquent que l'AMPc n'est pas impliqué de manière générale dans la répression du métabolisme secondaire par le glucose chez les actinomycètes. Tout d'abord, l'ajout d'AMPc ne permet pas de lever la répression du glucose sur les actinomycines synthases (Demain and Fang 1995 d'après Brown *et al.* 1983). Par ailleurs, le taux d'AMPc s'avère plus faible pendant la phase de production d'antibiotique que pendant la phase de croissance chez de nombreux producteurs d'antibiotiques tel que *S. fradiae* (producteur de tylosine, Vu-Trong *et al.* 1980) ou *Streptomyces hygroscopicus* (producteur de turimycine, Gersh *et al.* 1978).). En outre, chez *Streptomyces venezuelae*, producteur de chloramphénicol il n'y aucune augmentation du taux d'AMPc ni durant l'antibiogénèse, ni lors de l'induction sur lactose de la β -galactosidase réprimée sur glucose (Chatterjee and Vining 1982a, b). Enfin l'ajout de glucose chez *S. antibioticus* entraîne une augmentation de la quantité d'AMPc tout en diminuant la production d'oléandomycine (Lishnevskaja *et al.* 1986).

- Rôle potentiel des nucléotides adényliques phosphorylés (ATP, ADP, AMP) dans la régulation par la source de carbone

Le glucose pourrait aussi affecter la production d'antibiotique en entraînant une augmentation de la concentration intracellulaire en nucléotides adényliques phosphorylés. Ainsi, chez *S. ambofaciens*, lorsque le glucose est utilisé comme source de carbone à la place des dextrines, la concentration en ATP intracellulaire est 2,3 fois plus élevée alors que la production spécifique de spiramycine est 66 % plus faible (Lounès *et al.* 1995a). Par ailleurs, chez *S. fradiae*, l'ajout de glucose à 30 g L⁻¹ durant la phase de production de la tylosine conduit à son arrêt momentané et à l'augmentation simultanée de la concentration en nucléotides adényliques phosphorylés. Après diminution de leur concentration, la production de tylosine redémarre (Vu-Trong *et al.* 1980).

1.3.1.2. Source d'azote

Les ions ammonium exercent un effet négatif sur la production d'antibiotique chez les actinomycètes. Cela se traduit par un effet de la concentration et de la nature de la source d'azote sur la production d'antibiotiques.

- Effet négatif de la concentration en ammonium

L'augmentation de la concentration en ammonium dans le milieu de culture entraîne le plus souvent une diminution de la production en antibiotiques. La production spécifique de β -lactames par *S. clavuligerus* diminue de 84 % lorsque la concentration en ammonium initiale augmente de 20 à 80 mM (Braña *et al.* 1985). La production spécifique de spiramycine par *S. ambofaciens* est réduite de 69 % lorsque la concentration en ammonium initiale est de 100 mM au lieu de 25 mM (Lebrihi *et al.* 1992).

- Influence de la nature de la source d'azote

Par ailleurs, les sources inorganiques d'azote comme les sels d'ammonium supportent une bonne croissance bactérienne mais entraînent une faible production en métabolites secondaires. Dans le cas de nombreux métabolites la production est meilleure lorsque la source d'azote est organique. Les sources plus favorables à la production de métabolites secondaires sont les acides aminés et les sources complexes d'azote qui supportent une croissance lente et une assimilation progressive de l'azote (Tableau I-9). Ainsi, chez *S. ambofaciens*, lorsque 25 mM d'azote sont apportés, l'usage de la valine comme source d'azote permet d'atteindre une production spécifique de spiramycine de 27,7 mg g⁻¹ de matière sèche (MS) alors qu'en présence de chlorure d'ammonium elle n'est que de 15,8 mg g⁻¹ (Lebrihi *et al.* 1992).

Cependant, le choix de certains acides aminés comme source d'azote peut aussi entraîner une forte diminution de la production de métabolites secondaires surtout lorsqu'ils sont ajoutés en excès (Untrau *et al.* 1994, Lounès *et al.* 1995b, Castro *et al.* 1985). Ainsi, la production spécifique de spiramycine chez *S. ambofaciens* est de 20 mg g⁻¹ de MS lorsque le chlorure d'ammonium est utilisé à 25 mM comme source d'azote et de seulement 5,2 mg g⁻¹ lorsque l'arginine est utilisée à la même concentration. Par ailleurs, l'augmentation de la concentration en glutamate de 25 à 50 mM, lorsque celui-ci est utilisé comme unique source d'azote, entraîne une baisse de la production spécifique de 16,8 à 13,3 mg g⁻¹ de MS.

Cet effet négatif de certains acides aminés sur la production d'antibiotique peut être attribué à l'ammonium produit par leur catabolisme (Untrau *et al.* 1994, Lounès *et al.* 1995b). En effet, suivant les voies métaboliques empruntées (désamination ou transamination) et l'état nutritionnel en azote de la cellule, le catabolisme des acides aminés peut entraîner une production d'ammonium (Figure I-6).

Tableau I-9 Productions d'antibiotiques chez les actinomycètes favorisées par l'usage d'une source d'azote organique

Famille chimique	Antibiotique	Producteurs	Source privilégiée complexe	Source privilégiée synthétique	Référence
β-lactames	Céphamycines	<i>Streptomyces clavuligerus</i>		Asparagine glutamine, arginine, urée	Aharanowitz and Demain 1979, Brana <i>et al.</i> 1985
		<i>Streptomyces lactamadurans</i>			Castro <i>et al.</i> 1985
Aminoglycosides	Streptomycine	<i>Streptomyces griseus</i>		Proline	Dulaney 1948
Macrolides	Spiramycine	<i>Streptomyces ambofaciens</i>		Valine	Lebrihi <i>et al.</i> 1992, Laakel <i>et al.</i> 1994, Untrau <i>et al.</i> 1994, Lounès <i>et al.</i> 1995b et 1996b
	Tylosine	<i>Streptomyces fradiae</i>		Valine, leucine, iso-leucine, thréonine	Omura <i>et al.</i> 1984, Tanaka <i>et al.</i> 1986, Lee and Lee 1994
	Gilvocarcine	<i>Streptomyces arenae</i>		Acide aspartique, glycine	Byrne and Greenstein 1986
Divers	Streptolydigin	<i>Streptomyces lydicus</i>	Farine de soja, peptone	Acide glutamique	Li <i>et al.</i> 2007
Phénicolés	Chloramphénicole	<i>Streptomyces venezuelae</i>		Proline	Shapiro and Vining 1985

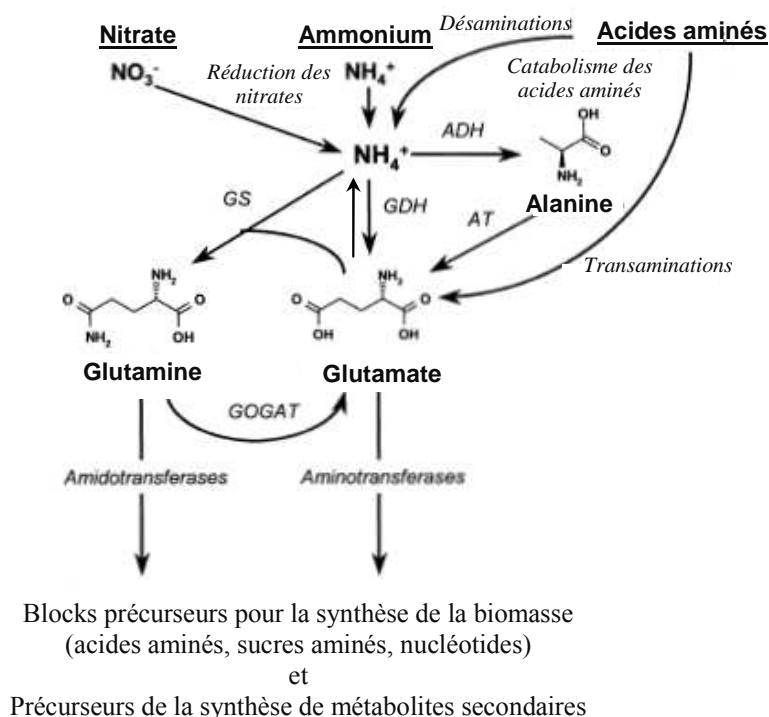


Figure I-6 Interconversions des molécules azotées dans le métabolisme central de l'azote chez *Streptomyces* (D'après Voelker and Altaba 2001). GDH, glutamate deshydrogénase ; GS, glutamine synthétase ; GOGAT, glutamate synthase ; ADH, alanine deshydrogénase ; AT, alanine transférase.

Il existe plusieurs procédés pour lever la répression exercée par l'ammonium sur la synthèse des antibiotiques. La première stratégie consiste à piéger l'ammonium du milieu de culture. Pour cela des agents trappeurs d'ions peuvent être ajoutés au milieu de culture, tels que le phosphate de magnésium ou de calcium (Omura *et al.* 1980, Byrne and Greenstein 1986, Brana *et al.* 1985, Wallace *et al.* 1990, Lounès *et al.* 1995b). Plus récemment, Park *et al.* (2007) ont rapporté le piégeage de l'ammonium sur une résine d'échange de cations. Une deuxième stratégie consiste à apporter progressivement la source d'azote en cultures fed-batch (Lounès *et al.* 1996b). Enfin, l'apport de précurseurs dont la synthèse est réprimée par l'ammonium peut permettre de lever en partie l'effet négatif de l'ammonium sur la synthèse de l'antibiotique. C'est le cas de la synthèse de la spiramycine lors de l'ajout d'isobutyrate (Lounès *et al.* 1995b).

L'effet négatif de l'ammonium sur la production des antibiotiques chez les actinomycètes s'exerce à travers plusieurs mécanismes qui sont détaillés par la suite.

- Diminution de la synthèse des précurseurs

Dans de nombreux cas, la formation des précurseurs est inhibée par l'ammonium (Omura *et al.* 1984, Tanaka *et al.* 1986).

L'ammonium affecte notamment le catabolisme des acides aminés qui fournit les acides gras volatiles précurseurs des macrolides. La répression par l'ammonium de certaines enzymes du catabolisme des acides aminés a été mise en évidence. Ainsi, la répression par l'ammonium de la valine deshydrogénase (VDH) (Lebrihi *et al.* 1992) et de la kétoisovalérate deshydrogénase (Lounès *et al.* 1995b) a été rapportée chez *S. ambofaciens* producteur de spiramycine. Chez *S. fradiae* producteur de tylosine, la répression de la VDH mais aussi de la thréonine deshydratase et de l'aspartate aminotransférase par l'ammonium a été également rapportée par Lee and Lee (1994). Par ailleurs, l'ammonium exerce aussi un effet négatif sur les protéases, dont l'activité permet le relargage d'acides aminés précurseurs des acides gras volatiles chez *S. ambofaciens* (Untrau *et al.* 1994). Enfin, l'activation des acides gras en acyl-CoA nécessaire à la synthèse de la spiramycine s'est aussi avérée affectée par l'ammonium par répression de l'acétyl-CoA carboxylase (Laakel *et al.* 1994).

- Répression et/ou inhibition des enzymes de la voie de biosynthèse

Cependant, la voie de biosynthèse des métabolites secondaires elle-même peut être réprimée par l'ammonium. Ainsi de nombreuses enzymes de la voie de biosynthèse des céphamycines sont réprimées par l'ammonium. Braña *et al.* (1985) ont rapporté la répression par l'ammonium de la cyclase, de l'expandase et de l'isopénicilline-N-épimérase chez *S. clavuligerus*. L'ACV synthétase, la cyclase et l'expandase de *S. lactamadurans* s'avèrent aussi réprimées par l'ammonium (Castro *et al.* 1985). Enfin, la répression de l'hydroxylase et de l'expandase de *Streptomyces cattleya* par la glutamine a également été observée (Khaoua *et al.* 1991).

- Augmentation du taux de croissance

L'influence négative de l'ammonium peut être aussi due, au moins en partie, à l'augmentation du taux de croissance consécutive à l'ajout d'ammonium. Certaines observations sur la production de spiramycine viennent soutenir cette hypothèse. Ainsi, Untrau *et al.* (1994) ont observé que l'inhibition de la production de spiramycine par l'ammonium est plus faible lorsque le taux de croissance est contrôlé par la concentration en phosphate.

I.3.1.3. Source de phosphate

Le phosphate inorganique inhibe la synthèse des antibiotiques chez les actinomycètes (Tableau I-10). Les nombreuses productions affectées par le phosphate ainsi que les modes de régulation mis en jeu ont été rapportés de manière exhaustive en 1977 par Martin dans une revue bibliographique.

Tableau I-10 Exemples de productions d'antibiotiques chez les actinomycètes affectées négativement par le phosphate

Famille chimique	Antibiotique	Producteurs	Quantité d'orthophosphate permettant la synthèse d'antibiotique (mM)	Référence
β-lactames	Céphamycines	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	25	Aharanowitz and Demain 1977
Aminoglycosides	Streptomycine	<i>Streptomyces griseus</i>	1 à 15	Perlman and Wagman 1952, Demain and Inamine 1970
	Gentamycine	<i>Micromonospora purpurea</i>	< 5,75	Obregon <i>et al.</i> 1994
	Kanamycine	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	2,8 à 5,7	Basak and Majumdar 1975
Antibiotiques peptidiques	Monamycines	<i>Streptomyces jamaicensis</i>	0,006 à 0,15	Hall and Hassal 1970
Macrolides	Tylosine	<i>Streptomyces fradiae</i>		Vu-Trong <i>et al.</i> 1980
	Actinorhodine	<i>Streptomyces coelicolor</i>	< 2,5	Doull and Vining 1990
	Turimycine	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	< 100	Gersch <i>et al.</i> 1979
	Spiramycine	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	5 à 10	Lounès <i>et al.</i> 1996a
	Candicidine	<i>Streptomyces griseus</i>	< 5	Gil and Campelo-Diez 2003
Tetracyclines	Chlortetracycline	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	< 2,8	Biffi <i>et al.</i> 1954, Prokofieva-Belgovskaya and Popova 1959
	Oxytetracycline	<i>Streptomyces rimosus</i>	<2,8	Zygmunt 1964
Quinones	Nanaomycine	<i>Streptomyces rosa</i>		Masuma <i>et al.</i> 1986

Non seulement le phosphate affecte le niveau de production des antibiotiques et les vitesses de formation, mais il peut aussi retarder le délai d'initiation de la synthèse des métabolites secondaires (Gersh *et al.* 1979, Dekleva *et al.* 1985). L'épuisement du phosphate pourrait permettre le déclenchement de la synthèse des métabolites secondaires. Sa capacité à retarder la synthèse de métabolites secondaires est donc probablement due au temps nécessaire à son épuisement. L'implication du phosphate dans l'initiation du métabolisme secondaire est soutenue par le fait que de nombreuses productions d'antibiotiques sont

simultanées à l'épuisement du phosphate dans le milieu (Martin 1977, Martin and Demain 1980).

Pour limiter l'impact du phosphate sur la production d'antibiotiques des ions sont ajoutés au milieu de culture pour complexer le phosphate (Masuma *et al.* 1986). Par ailleurs, les cultures sont réalisées à une concentration minimale en phosphate souvent limitante pour la croissance.

Plusieurs mécanismes d'action du phosphate ont été proposés par Martin (1977).

- Le phosphate agit par stimulation du métabolisme primaire

Tout d'abord, le phosphate pourrait affecter la synthèse des antibiotiques en stimulant le métabolisme primaire au dépend du métabolisme secondaire (Chapitre I.3.2, p.38). Ainsi, il a été observé que l'ajout de phosphate peut entraîner une augmentation de la croissance microbienne (Hall and Hassal 1970), ou du taux de croissance (Vu-Trong *et al.* 1981, Lounès *et al.* 1996a), une augmentation de la synthèse protéique et nucléotidique (Biffi *et al.* 1954, Prokofieva-Belgovskaya and Popova 1959, Mertz et Doolin 1973) et parfois une augmentation du taux d'utilisation des hydrates de carbone (Perlman and Wagman 1952, Vu-Trong *et al.* 1981) et de la respiration (Hostalek *et al.* 1964). L'épuisement du phosphate pourrait alors entraîner le ralentissement du métabolisme primaire nécessaire à l'initiation de la synthèse d'antibiotique.

- Le phosphate agit en changeant les flux dans les voies cataboliques des sucres

L'ajout de phosphate au milieu de culture pourrait favoriser le catabolisme des hydrates de carbone par la voie glycolytique au dépend de la voie des pentoses phosphate (Hostalek *et al.* 1963), qui semble favoriser la production d'antibiotiques (Ikeda *et al.* 1988, Obanye *et al.* 1996). Cette voie catabolique pourrait favoriser la production des métabolites secondaires en limitant le taux de croissance et/ou en soutenant une forte production de NADPH nécessaire à la synthèse des antibiotiques.

- Le phosphate inhibe la synthèse des précurseurs

Par ailleurs, de nombreuses enzymes impliquées dans la synthèse des précurseurs sont réprimées par le phosphate. Les enzymes malonyl-coenzyme A carboxyltransférase et

propionyl-coenzyme A carboxylase impliquées dans la synthèse des précurseurs de la tylosine chez *S. fradiae* sont réprimées par le phosphate (Vu-Trong *et al.* 1980). Par ailleurs, le niveau d'expression de la valine deshydrogénase impliquée dans la synthèse d'acides gras volatiles nécessaires à la synthèse du macrolide spiramycine chez *S. ambofaciens* (Lounès *et al.* 1996a) est plus faible en présence de phosphate. Enfin, la synthèse de l'acide p-aminobenzoïque (PABA), précurseur de la candicidine chez *S. griseus*, est inhibée par le phosphate par répression de la PABA synthétase au niveau transcriptionnel (Asturias *et al.* 1990).

- Action du phosphate par répression des enzymes de biosynthèse

Le phosphate pourrait aussi réguler la biosynthèse des antibiotiques en inhibant (par feedback) ou en réprimant les phosphatases impliquées dans la biosynthèse de métabolites secondaires (streptomycine). Walker et Walker (1971) ont ainsi montré l'inhibition par le phosphate de la guanidinodeoxy-scylo-inositol phosphate phosphatase de *S. griseus* qui catalyse une réaction clef dans la synthèse de la streptidine, intermédiaire de la streptomycine.

Au-delà de son action sur les phosphatases, le phosphate agit aussi sur l'expression de différentes enzymes des voies de biosynthèse (Tableau I-11).

Tableau I-11 Inhibition de la synthèse d'antibiotique par le phosphate impliquant une répression des enzymes de biosynthèse.

Famille chimique	Antibiotique	Producteurs	Enzyme réprimée	Référence
β-lactames	Céphamycines	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Expandase, cephamycine synthetase	Lübbe <i>et al.</i> 1985, Lebrihi <i>et al.</i> 1987
Aminoglycosides	Streptomycine	<i>Streptomyces griseus</i>	Amidinotransférase	Demain and Inimine 1970
Macrolides	Candicidine	<i>Streptomyces griseus</i>		Martin and Mc Daniell 1976, Gil and Campelo-Diez 2003
Tetracyclines	Chlortetracycline	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Anhydrotetracycline oxygenase	Behal <i>et al.</i> 1982
	Oxytetracycline	<i>Streptomyces rimosus</i>	Anhydrotetracycline oxygenase, Tetracycline polyketide synthase	Mc Dowall <i>et al.</i> 1999

Dans certains cas, il a été identifié que la régulation avait lieu au niveau transcriptionnel. Ainsi la transcription de l'ensemble des gènes de biosynthèse de la candicidine (chez *S. griseus*) et de l'oxytetracycline (McDowall *et al.* 1999) est réprimée par

le phosphate. L'effecteur direct de l'ensemble de ces mécanismes de régulations reste à déterminer. Il peut s'agir du phosphate libre, de métabolites phosphorylés tels que les nucléotides phosphorylés (ATP, AMPc, ppGpp) (Gersch *et al.* 1979, Vu-Trong *et al.* 1981, Lounès *et al.* 1996a), des polyphosphates (Chouayekh et Virolle 2002) ou encore de la charge énergétique.

I.3.2. Influence du taux de croissance

La production de métabolites secondaires est la plupart du temps associée à une absence de croissance ou à une croissance faible. Il était traditionnellement admis, au début de l'étude de la biosynthèse des antibiotiques, que la synthèse des métabolites secondaires avait lieu pendant une phase de production aussi appelée « idiophase » qui succédait à la phase de croissance ou « trophophase » (Bu'lock *et al.* 1975). Par la suite, les différentes études menées sur des milieux de culture synthétiques puis en chemostat ont montré que la production de métabolites secondaires pouvait être associée à la croissance. Ainsi, les cultures en chemostat ont montré que la production d'antibiotique pouvait avoir lieu avec une croissance non nulle mais que la production de métabolites secondaires était meilleure à des taux de croissance faibles (Vu-Trong and Gray 1981, Lebrihi *et al.* 1988b, McIntyre *et al.* 1996, Pamboukian and Faciotti 2004). Le profil de production (production dissociée de la croissance, partiellement associée ou complètement associée) est par ailleurs dépendant du milieu de culture utilisé. L'usage d'un milieu synthétique à la place d'un milieu plus riche peut ainsi amener une production biphasique à être partiellement associée à la croissance (Mc Dermott *et al.* 1993, Fazeli *et al.* 1995, Untrau-Taghian *et al.* 1995).

Le fait qu'un taux de croissance élevé soit souvent corrélé à une faible production de métabolites secondaires laisse à penser qu'un faible taux de croissance pourrait initier le métabolisme secondaire. Cependant, dans la plupart des cas, il est difficile de savoir ce qui détermine l'initiation du métabolisme secondaire à savoir le taux de croissance faible ou bien la limitation nutritionnelle qui y est la plupart du temps associée. Par ailleurs, dans quelques cas, comme la synthèse d'érythromycine par *Streptomyces erythraeus* (Trilly *et al.* 1987) ou de la chlortétracycline par *S. aureofaciens* (Sikyta *et al.* 1961), la production d'antibiotique en chemostat augmente avec le taux de croissance.

I.3.3. Induction du métabolisme secondaire

Le métabolisme secondaire n'est pas seulement soumis à un contrôle des sources nutritionnelles. D'autres signaux se sont avérés importants pour la synthèse des antibiotiques et l'induction du métabolisme secondaire. Leur effet et leur mécanisme d'action sont décrits ici.

I.3.3.1. Les précurseurs

Les précurseurs sont capables de stimuler la production d'antibiotiques en induisant les enzymes de biosynthèses. Un exemple typique est la stimulation de la production de l'alkaloïde de l'ergot par le tryptophane. Krupinsky *et al.* (1976) ont montré que le tryptophane, lorsqu'il est ajouté à 4 mM, améliore la production de l'alkaloïde de l'ergot en induisant la diméthylallyltryptophane synthétase, la première enzyme de biosynthèse de ce métabolite. Par ailleurs, il a été observé que la méthionine, précurseur de la céphalosporine C chez *Cephalosporium acremonium*, induit les enzymes de la voie de synthèse de la céphalosporine C: l'ACV synthétase, l'isopénicilline N synthase (cyclase) et la déacétoxycephalosporine C synthase (expandase) lorsqu'elle est ajoutée à une concentration de 0,32 % (21,4 mM) (Zhang *et al.* 1987, Demain and Zhang 1998). Enfin, certaines enzymes impliquées dans la formation des précurseurs s'avèrent induites par leur propre substrat. Ainsi Rius *et al.* (1996) ont observé que la lysine induit la L-lysine ϵ -aminotransférase une enzyme impliquée dans la conversion de la L-lysine en acide L- α -aminoadipique, un précurseur des céphamycines chez *S. clavuligerus*. En outre, la valine deshydrogénase, la première enzyme du catabolisme de la valine qui fournit du butyrate, du propionate et du méthyl-malonate pour la biosynthèse des macrolides est induite par la valine chez *S. aureofaciens*, *S. fradiae* et *S. avermitilis* (Nguyen *et al.* 1995a, b).

I.3.3.2. Les inducteurs non spécifiques

D'autres molécules appelées γ -butyrolactones s'avèrent capables de réguler la production d'antibiotiques. La première γ -butyrolactone a été identifiée par Khoklov *et al.* en 1967 à partir d'une culture de *S. griseus*. Cette molécule signal est aussi connue sous le nom

de facteur A ou facteur d'auto-régulation. Depuis, 14 autres γ -butyrolactones qui diffèrent par leurs acides latéraux et issues de 7 espèces de *Streptomyces* ont été découvertes (Figure I-7).

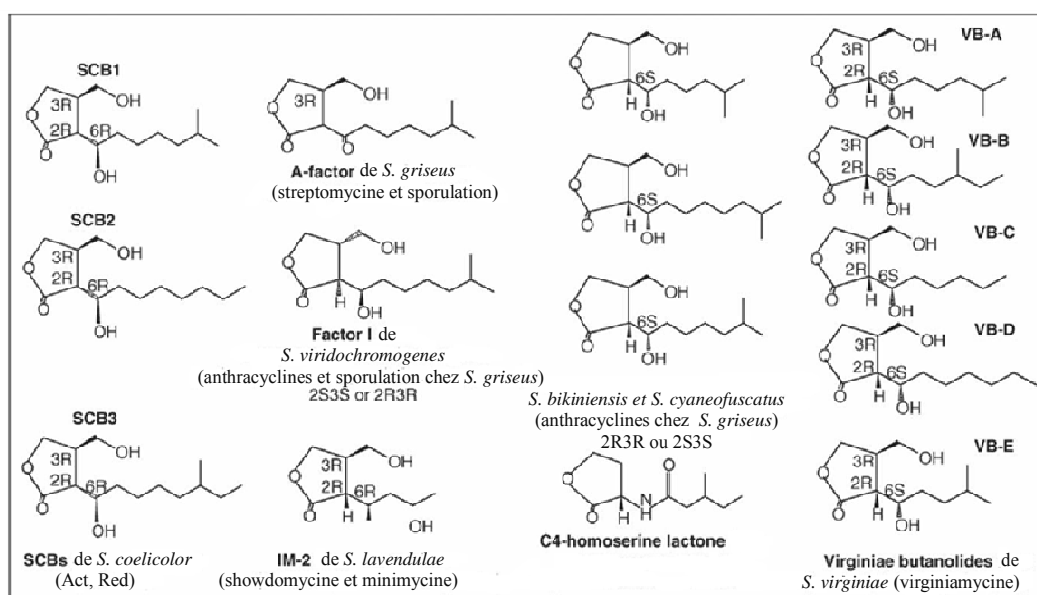


Figure I-7 Structures chimiques des γ -butyrolactones issues de *Streptomyces* et C4-homosérine lactone issue de *Pseudomonas aeruginosa*. Le nom de la molécule apparaît en gras. L'antibiotique ou les fonctions qui sont affectés apparaissent entre parenthèses. Act : actinorhodine, Red : undécylprodigiosine. Figure issue de Tanako 2006.

Ces molécules agissent comme un inducteur à des concentrations aussi basses que le nanomolaire. Elles induisent non seulement la production des métabolites secondaires mais contrôlent aussi dans la plupart des cas la différenciation morphologique.

Les γ -butyrolactones agissent en se liant à des protéines régulatrices, dites protéines réceptrices, en inhibant la liaison de ces protéines à l'ADN. Comme nombre de ces protéines agissent comme des répresseurs, leur liaison aux butyrolactones entraîne l'induction des gènes cibles (Tanako 2006). Dans le cas de la production de streptomycine par *S. griseus* la cascade de régulation qui permet le contrôle de la production par le facteur A a été identifiée (Horinouchi *et al.* 2001, Figure I-8). Le processus inclue une première étape de liaison du facteur A à une protéine réceptrice Arp A qui permet l'expression de *adpA*. AdpA agit ensuite comme un activateur de transcription de *strR* et *aphD*. Finalement, StrR agit comme un activateur de transcription, spécifique de la voie de biosynthèse.

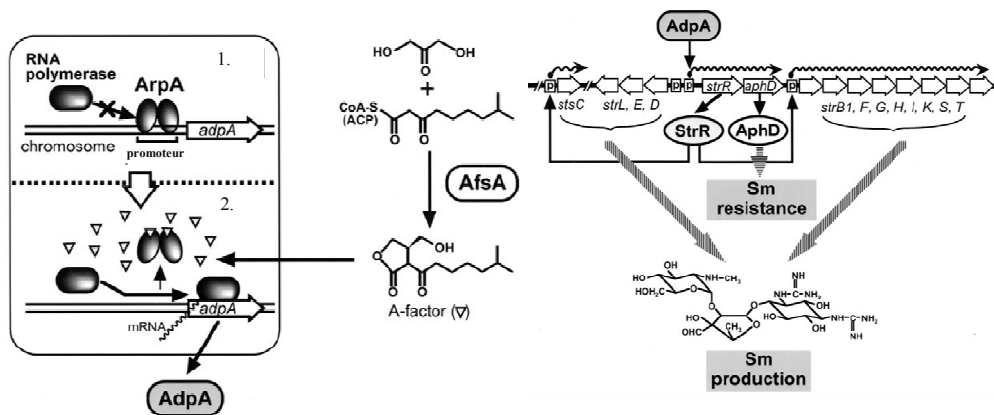


Figure I-8 Cascade de régulation conduisant à l'induction par le facteur A de la production de streptomycine de *S. griseus*. Le facteur A se lie à la protéine réceptrice ArpA et permet l'expression de *adpA*. AdpA agit ensuite comme un activateur de transcription de *strR* et *aphD*. StrR est un activateur de transcription spécifique de la voie de biosynthèse. StrR induit les gènes de biosynthèse de la streptomycine en se liant à de multiples sites sur le cluster. AphD confère à *S. griseus* la résistance à la streptomycine. Figure issue de Horinouchi *et al.* 2001.

I.3.3.3. Les messagers nucléotidique phosphorylé AMPc, ppGpp

L'AMPc et le ppGpp, messagers nucléotidiques phosphorylés dont le rôle régulateur est bien identifié chez certaines bactéries comme *E. coli*, pourraient également jouer un rôle dans l'initiation de la synthèse des métabolites secondaires. Leur rôle pourrait être intimement lié à la présence de certaines sources nutritionnelles dans la cellule: le glucose pour l'AMPc (I.3.1.1), les acides aminés pour ppGpp. Leur rôle comme inducteur du métabolisme secondaire sera cependant rapporté ici indépendamment de l'effet des sources nutritionnelles car le lien établi entre ces effecteurs phosphorylés et l'initiation de la synthèse d'antibiotique n'a pas toujours été mis en relation avec l'état nutritionnel de la cellule.

- **Le rôle de la réponse stringente, ou synthèse de ppGpp, dans l'initiation du métabolisme secondaire**

Chez *E. coli*, un mécanisme de réponse à l'épuisement des acides aminés dans la cellule a été découvert et précisément caractérisé (Figure I-9). Ce mécanisme est aussi appelé « réponse stringente ». Ainsi, lorsque le contenu cellulaire en acides aminés s'épuise, une forte synthèse du nucléotide phosphorylé ppGpp s'initie ce qui entraîne, entre autres, une diminution de la synthèse des ARN ribosomiaux et des ARN de transfert et une stimulation de

la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés (Takano and Bibb 1994).

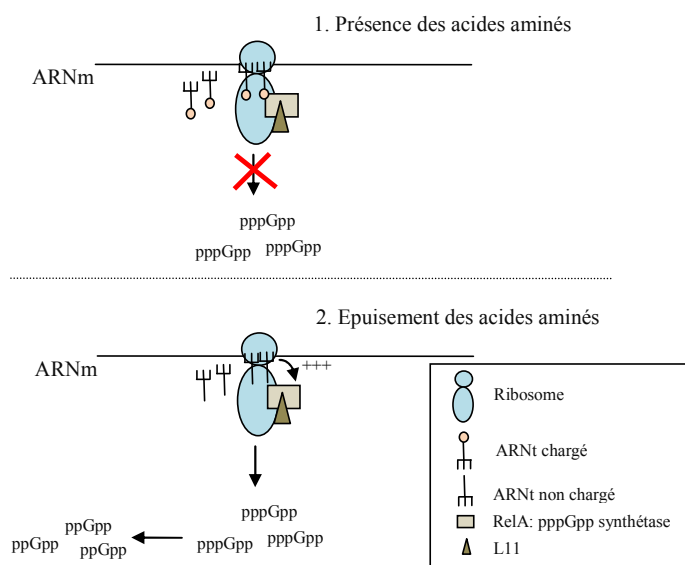


Figure I-9 Mécanisme de la réponse stringente chez *E. coli* d'après Takano et Bibb (1994). En cas d'épuisement des acides aminés (2.), la fixation d'ARNt non chargés, au site A du ribosome, active la pppGpp synthétase RelA. La formation de ppGpp à partir de pppGpp est ensuite catalysée par une pppGpp 5'-phosphohydrolase.

Chez les *Streptomyces*, le rôle possible du ppGpp dans l'initiation de la synthèse des métabolites secondaires fait débat. Certaines études suggèrent un lien entre l'augmentation du niveau de ppGpp et le déclenchement de la production de métabolites secondaires. Les résultats d'Ochi (1986) montrent que l'initiation de la synthèse de formycine chez *Streptomyces lavendulae* est associée à un niveau élevé en ppGpp. Par ailleurs des mutants de *S. lavendulae* déficients pour L11 (une protéine nécessaire pour la synthèse de pppGpp par RelA) et incapables de synthétiser ppGpp ne produisent pas de formycine. De même, des mutants de *S.coelicolor* déficients pour L11 et Rel A, non producteurs de ppGpp, ne synthétisent pas d'undécylprodigiosine et d'actinorhodine (Ochi 1990, Chakraborty and Bibb 1997, Hoyt and Jones 1999). Cependant, l'initiation de la synthèse de métabolites secondaires n'apparaît pas systématiquement associée à niveau élevé de ppGpp. Ainsi, An et Vining (1978) ont observé une chute du niveau de ppGpp avant le début de la production de streptomycine chez *S. griseus*. De même, aucune corrélation n'a pu être trouvée entre le niveau de ppGpp et l'initiation de la synthèse de céphamycines chez *S. clavuligerus*. Par

ailleurs, chez les mutants de *S. clavuligerus* incapables de synthétiser ppGpp, la synthèse de céphamycines n'est pas affectée (Bascaran *et al.* 1991).

- Le rôle du niveau d'AMPc dans l'initiation du métabolisme secondaire

Kang *et al.* (1999) ont rapporté l'existence de mutants HO2 de *S. griseus* déficients pour le facteur A et qui ne sont pas soumis à sa régulation car ils sont déficients pour la protéine Arp A (Figure I-9). Ces mutants sont donc producteurs de mycélium aérien, de spores et de streptomycine. L'ajout d'AMPc à leur milieu de culture entraîne une suppression de la différenciation morphologique et de la synthèse de streptomycine. Ainsi, l'AMPc réprimerait la différenciation morphologique et chimique chez les mutants non soumis à la régulation par le facteur A. Par contre l'ajout d'AMPc n'a pas d'effet sur la souche sauvage, indiquant que le rôle régulateur de l'AMPc est secondaire à celui du facteur A.

I.4. Influence du milieu de culture sur la croissance et la production des dithiolopyrrolones de *Sa. algeriensis*

L'influence du milieu de culture sur la production des métabolites secondaires a été largement rapportée dans la littérature comme décrit en I.3. Les sources nutritionnelles influencent à la fois le niveau de production des antibiotiques, mais aussi l'initiation de la synthèse de métabolites secondaires et les profils de production (production biphasique ou associée à la croissance). Par conséquent, l'influence du milieu de culture sur la croissance et la production des dithiolopyrrolones a été étudiée chez *Saccharothrix algeriensis* (Bouras 2005, Strub 2008) à la fois pour :

- mieux comprendre les mécanismes de régulation qui s'exercent sur la production de dithiolopyrrolones
- améliorer les rendements en antibiotiques
- influencer sur la nature des antibiotiques synthétisés

I.4.1. Recherche d'un milieu synthétique pour la croissance de *Sa. algeriensis*

Un milieu synthétique a été recherché pour l'étude physiologique de *Sa. algeriensis* (Bouras 2005, Lamari 2006) et plus particulièrement pour la modélisation de son comportement en fermenteur (Strub 2008). Un milieu semi-synthétique (SS) a d'abord été mis au point (Bouras 2005, Lamari 2006). Il est composé (par litre d'eau distillée) de 10 g de D(+) glucose, 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g de NaCl, 0,5 g de KH_2PO_4 , 1 g de K_2HPO_4 , 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 g d'extrait de levure et 5 g de CaCO_3 . Ce milieu est appelé semi-synthétique car sa composition est presque totalement déterminée. Il contient seulement 2 g L^{-1} d'une source nutritive complexe : l'extrait de levure. Il comporte également du glucose qui s'est avéré être une meilleure source de carbone pour la production des dithiolopyrrolones que les dextrines et l'amidon (Lamari 2006). Enfin la composition du milieu SS comprend du carbonate de calcium. Celui-ci favorise à la fois la croissance et la production des dithiolopyrrolones. Cet effet est probablement attribuable à son pouvoir tampon et à sa capacité à séparer les pelotes de mycélium ce qui favorise les transferts de matière (Lamari 2006). Cependant, il rend la détermination la masse sèche (MS) bactérienne plus laborieuse. La cinétique de croissance de *Sa. algeriensis* sur milieu SS a été rapportée par Bouras *et al.* (2006a) (Figure I-10).

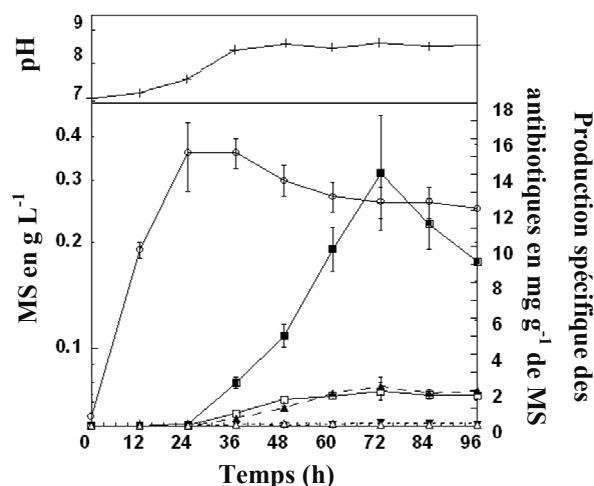


Figure I-10 Evolution des productions spécifiques en thiolutine (■), sénécioyl-pyrrothine (□), tigloyl-pyrrothine (▲), iso-buteryl-pyrrothine (▼), butanoyl-pyrrothine (Δ), de la masse sèche (MS, ○) et du pH (+) lors de cultures de *Sa. algeriensis* en Erlenmeyers de 500 mL contenant 100 mL de milieu SS à 10 g L^{-1} de glucose, ensemencés avec 5 % v/v d'une pré-culture âgée 48 h et incubés à 30°C et 240 RPM d'après Bouras *et al.* (2006a).

Cette cinétique de 96 h montre que *Sa. algeriensis* croît fortement de 0 à 24 h jusqu'à la valeur maximale de 0,36 g de MS puis que la biomasse se maintient jusqu'à 36 h. Après 36 h la biomasse mesurée chute, probablement à cause d'un phénomène de lyse cellulaire.

Par la suite, Strub (2008) a apporté quelques modifications au milieu SS pour faciliter à la fois la détermination de la masse sèche et le travail en fermenteur (milieu SS-MOPS). La composition du milieu semi-synthétique a été conservée mais le carbonate de calcium a été remplacé par du MOPS (18 g L^{-1}) et du CaCl_2 ($0,9 \text{ g L}^{-1}$). Ce milieu stimule la croissance de *Sa. algeriensis* puisqu'il permet d'obtenir 2 g L^{-1} et $2,25 \text{ g L}^{-1}$ de MS après 50 et 150 h de culture respectivement.

Enfin, différents milieux synthétiques ont été testés pour la croissance de *Sa. algeriensis* (Strub 2008). Leur composition est celle du milieu SS-MOPS mais l'extrait de levure a été substitué tour à tour par des acides aminés, des bases azotées et des oligoéléments. En effet, sans extrait de levure (milieu SS-ELneg) la croissance de *Sa. algeriensis* s'avère très faible : la MS est inférieure à $0,5 \text{ g L}^{-1}$ après 150 h de culture.

L'ajout d'acides aminés au milieu SS-ELneg a permis d'améliorer la croissance par rapport à un milieu sans extrait de levure. Ainsi l'ajout de TYR, SER, THR, CYST et de MET, simultanément, à une concentration de 5 mM chacun, permet d'atteindre une masse sèche maximale de $1,51 \text{ g L}^{-1}$ après 150 h. Cependant, cette biomasse maximale reste inférieure à celle obtenue sur milieu SS-MOPS ($2,25 \text{ g L}^{-1}$). Par ailleurs, la croissance sur milieu synthétique est plus lente que sur le milieu de référence. Après 50 h, la biomasse est de $0,43 \text{ g L}^{-1}$ sur milieu synthétique et de 2 g L^{-1} sur milieu SS-MOPS.

La croissance est également meilleure sur un milieu sans extrait de levure, s'il est supplémenté en bases azotées. L'ajout d'uracile à 20 mM permet notamment d'atteindre une masse sèche de $1,33 \text{ g L}^{-1}$ à 200 h mais là encore la croissance s'avère très ralentie. En effet, moins de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de matière sèche sont produits après 50 h de culture.

Enfin, seul l'ajout d'oligoéléments au milieu SS-ELneg permet de surpasser le poids sec maximal obtenu sur milieu SS-MOPS ($2,25 \text{ g L}^{-1}$). Une biomasse de $3,3 \text{ g L}^{-1}$ est obtenue après 330 h de culture (et non 150 h) sur un milieu synthétique contenant un pool d'oligoéléments mais la croissance ne démarre qu'après 100 h de culture rendant l'usage de ce milieu difficile.

Ainsi, aucun milieu synthétique ne pouvant supporter une croissance aussi forte et rapide que le milieu SS-MOPS n'a pu être trouvé. Par conséquent les études physiologiques menées sur *Sa. algeriensis* ont été réalisées sur des milieux semi-synthétiques, SS ou SS-MOPS, comportant 2 g L⁻¹ d'extrait de levure (Bouras 2005, Strub 2008).

I.4.2. Cinétique de production et de croissance des dithiopyrrolones sur milieu semi-synthétique

Une cinétique de production des dithiopyrrolones sur milieu SS a été proposée par Bouras *et al.* (2006a) (Figure I-10). Les résultats obtenus indiquent que la production des dithiopyrrolones commence après 36 h de culture alors que la biomasse est maximale (0,36 g L⁻¹ de MS). Les auteurs décrivent donc une production de dithiopyrrolones complètement découplée de la croissance. Par ailleurs, dans ces conditions de culture, la thiolutine est produite très majoritairement. La production spécifique maximale est atteinte à 72 h pour l'ensemble des dithiopyrrolones. Les valeurs obtenues pour la thiolutine, SEP, TIP, ISP et BUP sont de respectivement 19,92 mg g⁻¹, 2,74 mg g⁻¹, 2,87 mg g⁻¹, 0,25 mg g⁻¹ et 0,19 mg g⁻¹.

Par contre, en fermenteur batch sur milieu SS-MOPS et en présence de glucose à 15 g L⁻¹ et d'uracile à 20 mM, la croissance de *Sa. algeriensis* peut être divisée en quatre phases (Strub 2008). La première phase est une période de croissance d'une durée de 20 h pendant laquelle il y a production de 0,96 g L⁻¹ de biomasse. Elle est suivie d'une phase de fort ralentissement de la croissance jusqu'à 40 h de culture. Puis une seconde croissance est de nouveau observée jusqu'à 100 h et à l'issue de cette phase la biomasse est à son niveau maximale de 5 g L⁻¹. Ensuite la biomasse mesurée décroît jusqu'à la fin de la cinétique (145 h). Dans ces mêmes conditions la production de thiolutine n'est alors pas complètement découplée de la croissance. Elle démarre dès 14,5 h et se déroule jusqu'à 40 h, lors de la phase de ralentissement de la croissance. A l'issue de cette phase, la concentration en thiolutine, 32 mg L⁻¹, est maximale. La reprise de la croissance est ensuite associée à une diminution de la concentration en thiolutine. Enfin, lorsque la biomasse diminue la concentration en thiolutine augmente de nouveau. Par ailleurs il semblerait que *Sa. algeriensis* utilise séquentiellement les acides aminés et le glucose comme source de carbone. La production des dithiopyrrolones semble consécutive à l'épuisement d'un ou plusieurs acides aminés. Enfin,

l'arrêt de la production pourrait être concomitant avec la reprise de la croissance sur un autre substrat carboné, le glucose (Strub 2008).

I.4.3. Influence de l'ajout de précurseurs sur la production des dithiopyrrolones

Le niveau de production des métabolites secondaires dépend à la fois de la quantité de précurseurs disponibles et du niveau d'activité des enzymes de la voie de biosynthèse. L'effet de l'ajout des précurseurs des dithiopyrrolones au milieu de culture de *Sa. algeriensis* a donc été étudié afin de mieux connaître les paramètres nutritionnels qui influencent la synthèse de dithiopyrrolones et d'optimiser le milieu de culture pour leur production (Bouras *et al.* 2006a, b, 2007, 2008).

I.4.3.1. Influence des acides aminés soufrés

D'après Furumai *et al.* (1982) la cystine, issue de la condensation de deux cystéines, serait le précurseur du noyau pyrrothine. Par ailleurs, il existe une voie de conversion de la méthionine en cystéine chez de nombreuses espèces de streptomycètes (Chang and Vining 2002). Les acides aminés soufrés (cystéine, cystine, méthionine) sont donc des précurseurs potentiels des dithiopyrrolones. Leur ajout au milieu de culture SS a d'ailleurs montré une influence sur la production des dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis* (Bouras *et al.* 2006a, b). De plus, cet effet s'est avéré dépendant de leur nature et de la concentration à laquelle ils sont ajoutés. Ainsi, la production spécifique maximale de thiolutine (Figure I-11A.) est obtenue en présence de 5 mM de cystine tandis que les productions spécifiques maximales de SEP, TIP et BUP (Figure I-11B., Figure I-11C. et Figure I-11E. respectivement) sont obtenues à une concentration de 10 mM. La production spécifique maximale d'ISP (Figure I-11D.) est quant à elle obtenue en présence de 5 mM de cystéine. L'ajout de cystéine et de cystine à une concentration excessive (40 mM) exerce cependant un effet négatif sur la production spécifique des dithiopyrrolones. Enfin, la méthionine, tout comme son analogue l'éthionine, a un effet négatif sur la production spécifique de l'ensemble des dithiopyrrolones à 5 mM sans inhibition de la croissance (Figure I-11F.).

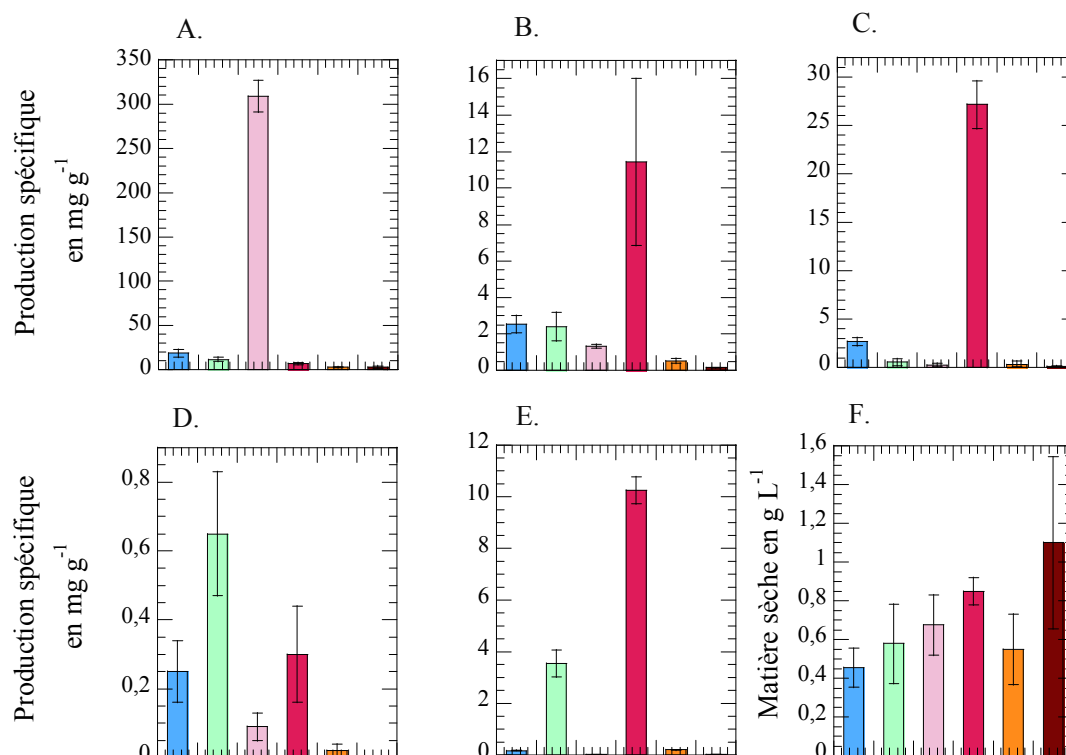


Figure I-11 Productions spécifiques en dithiopyrrolones et matière sèche (MS) obtenues à 72 h* sur milieu de culture SS supplémenté en acides aminés soufrés: contrôle (■), cystéine à 5 mM (■), cystine à 5 mM (■), cystine à 10 mM (■), méthionine à 5 mM (■) et éthionine à 5 mM (■). A. Production spécifique de thiolutine, B. Production spécifique de SEP, C. Production spécifique de TIP, D. Production spécifique d'ISP, E. Production spécifique de BUP et F. Production de MS. Les productions spécifiques maximales sont indiquées en mg g⁻¹ et la production maximale de MS en g L⁻¹. *La valeur pour le milieu SS + cystine 10 mM est la valeur maximale obtenue sur 96 h de culture. Figures réalisées d'après Bouras *et al.* (2006a, b)

L'ajout de la cystéine et de la cystine au milieu de culture de *Sa. algeriensis* semble bien favoriser à certaines concentrations la biosynthèse des dithiopyrrolones. Cependant, l'effet observé est très variable selon la dithiopyrrolone considérée. Il semblerait donc que l'effet exercé par ces acides aminés sur la production des dithiopyrrolones ne soit pas limité à leur rôle de précurseur du noyau pyrrothine et qu'ils aient d'autres rôles de régulation en tant que source de carbone et d'azote (Bouras *et al.* 2006a, b, Aharanowitz 1980, Chapitre I.3, p. 26).

I.4.3.2. Influence des acides organiques

Les acides organiques sont également de potentiels précurseurs des dithiolopyrrolones. En effet, l'acylation du noyau pyrrothine à partir d'acides organiques activés sous forme d'acyls-CoA pourrait permettre la formation des dithiolopyrrolones (Furumai *et al.* 2002). La nature de l'acyl-CoA formant la liaison amide avec la pyrrothine détermine donc la nature du groupement R2 de la dithiolopyrrolone synthétisée. Le contrôle de la nature du groupement R2 est d'intérêt puisque ce radical variable influence l'activité biologique des dithiolopyrrolones (I.2.4, p. 23). Bouras *et al.* (2007, 2008) ont par conséquent décrit l'effet des acides organiques, lorsqu'ils sont ajoutés à 5 mM, sur la nature et le niveau de production des dithiolopyrrolones formées. L'ajout d'acides organiques au milieu de culture influence d'abord le niveau de production des dithiolopyrrolones déjà produites sur le milieu SS basal et cette influence est très variable suivant le dérivé dithiolopyrrolone considéré (Bouras *et al.* 2007). Parmi les acides organiques, qui ont montré un effet positif significatif sur la production des dithiolopyrrolones (Tableau I-12) deux grands cas se distinguent :

- Modèle n° 1 : L'acide organique est le précurseur direct de la dithiolopyrrolone dont la production est favorisée et sa structure correspond au radical R2.
- Modèle n° 2 : L'acide organique n'est pas le précurseur direct de la dithiolopyrrolone dont la synthèse est stimulée et sa structure ne correspond pas au radical R2.

Ainsi, **suivant le modèle n°1**, l'ajout d'acide butyrique et d'acide tiglique a permis de multiplier respectivement par 14,9 et 7,4 la production spécifique de butanoyl-pyrrothine (BUP) et de tigloyl-pyrrothine (TIP). L'ajout d'acide acétique n'a par contre pas montré d'effet significatif sur la production de thiolutine. L'acide iso-butyrique et l'acide sénécioïque n'ont quant à eux pas été testés lors de cette étude.

De nombreux acides organiques ont aussi exercé un effet **suivant le modèle n° 2**. Ainsi, l'ajout d'acide sorbique a permis de multiplier la production spécifique de BUP par 118. La production spécifique d'iso-butyryl-pyrrothine a été multipliée par 21,6 en présence d'acide crotonique. Enfin, l'ajout d'acide 4-bromobenzoïque dans le milieu de culture a entraîné une production spécifique de sénécioyl-pyrrothine (SEP) 20,7 fois plus élevée.

Tableau I-12 Effet de différents acides organiques, ajoutés à 5 mM, sur la croissance et la production spécifique en dithiolopyrrolones (Bouras *et al.* 2007). Les valeurs ont été déterminées à 72 h de fermentation et correspondent à la moyenne de deux expériences. ND : dithiolopyrrolones non détectables. LSD : la plus petite différence significative (test de Fisher, p -value < 0,05).

	MS en g L ⁻¹	Production spécifique en mg g ⁻¹ de MS (facteur d'augmentation par rapport au contrôle, s'il est significatif)				
		Thiolutine	ISP	BUP	SEP	TIP
Contrôle	0,615	16,17	0,35	0,22	2,84	2,99
Sorbique	1,275	7,02	1 (2,85)	26 (118,18)	1,86	1,15
Valérique	0,885	7,14	ND	0,07	26,27 (9,25)	0,21
Succinique	0,955	9,23	0,08	0,18	9,23 (3,25)	1,82
Tiglique	1,450	10,61	0,52	0,15	1,90	22,15 (7,41)
3,4-dihydroxybenzoïque	0,885	10,84	1,31 (3,74)	ND	3,58	2,18
Butyrate	0,985	14,23	0,02	3,27 (14,86)	2,44	0,69
2,6-dihydroxybenzoïque	0,875	18,06	0,13	0,18	7,17 (2,52)	3,16
Pêlargonique	0,855	24,19	ND	0,14	12,80 (4,51)	4,38
Adipique	0,955	24,51	1,36 (3,89)	0,82	10,99	6,63 (2,22)
Tartarique	0,995	29,21	1,64 (4,69)	0,69	19,09 (6,72)	16,65 (5,57)
Malique	0,945	32,57 (2,01)	ND	0,19	2,32	2,23
Lactique	0,885	33,84 (2,09)	0,65	0,23	6,63 (2,96)	1,51
Méthacrylique	0,990	35,02 (2,17)	0,21	6,03 (27,41)	21,76 (7,66)	2,29
Sébacique	0,875	35,20 (2,18)	0,09	0,80	6,48	9,56 (3,2)
Homovanillique	0,650	35,53 (2,2)	0,10	0,13	1,81	1,18
EDTA	0,625	35,90 (2,22)	0,03	0,17	0,91	0,84
Na-3 Sulfobenzoïque	0,915	35,92 (2,22)	0,32	0,54	6,42	3,02
5-sulfosalicylique	0,905	39,43 (2,44)	ND	0,13	0,54	0,75
Formique	0,630	40,26 (2,49)	0,25	0,15	4,82	2,03
Cinnamique	1,895	40,94 (2,53)	0,08	0,27	1,75	1,77
Vératrique	0,955	42,30 (2,61)	0,51	0,51	9,37 (3,3)	4,59
Téréphthalique	0,695	42,93 (2,65)	0,20	0,66	6,76 (2,38)	4,53
Fumérique	0,975	42,93 (2,75)	0,75 (2,14)	0,56	12,0 (4,23)	7,50
Malonique	0,980	54,26 (3,35)	ND	0,41	8,23 (2,9)	8,40 (2,81)
Crotonique	1,120	57,33 (3,54)	7,56 (21,6)	0,52	5,74 (2,02)	1,61
4-Chlorobenzoïque	0,885	57,54 (3,56)	0,03	0,25	4,19	1,44
Benzoïque	1,290	58,24 (3,60)	0,03	0,29	0,50	0,71
Pimélique	1,305	59,02 (3,65)	0,33	0,55	16,97 (5,98)	13,14 (4,39)
Orotique	0,875	61,68 (3,81)	0,24	0,77	6,48 (2,28)	6,14 (2,05)
4-Bromobenzoïque	1,555	68,97 (4,26)	0,16	2,60 (11,82)	58,69 (20,67)	10,98 (3,67)
Na-Pyruvate	0,995	70,05 (4,33)	0,35	3,07 (13,95)	4,67	3,56
Pivalique	1,025	70,14 (4,34)	0,41	0,44	7,42 (2,61)	3,60
Panthoténique	1,100	70,75 (4,37)	0,44	1,61 (7,32)	9,54 (3,36)	6,03
1,2,4,5-benzenetetra-carboxylique	0,825	71,12 (4,40)	0,23	0,72	6,90 (2,43)	5,55
4-hydroxybenzoïque	0,975	72,24 (4,47)	0,45	0,73	19,86 (6,99)	6,28 (2,1)
Maléique	0,975	73,61 (4,55)	1,62 (4,63)	0,63 (2,86)	15,06 (5,58)	14,09 (4,71)
LSD	0,639	16,33	0,37	0,67	3,03	3,12

Par ailleurs, la production spécifique de SEP et de BUP a été fortement stimulée par l'ajout de l'acide valérique et méthacrylique respectivement. Dans ces deux cas (parmi d'autres) il est possible d'émettre des hypothèses quant aux voies métaboliques permettant de convertir l'acide organique ajouté, en précurseur directe de la dithiolopyrrolone dont la production est augmentée. Ainsi, certaines voies métaboliques bactériennes (notamment du catabolisme des acides aminés branchés) pourraient permettre la conversion de l'acide

valérique et méthacrylique en sénéciol-CoA et butyryl-CoA respectivement (d'après Zhang *et al.* 1999, Figure I-12).

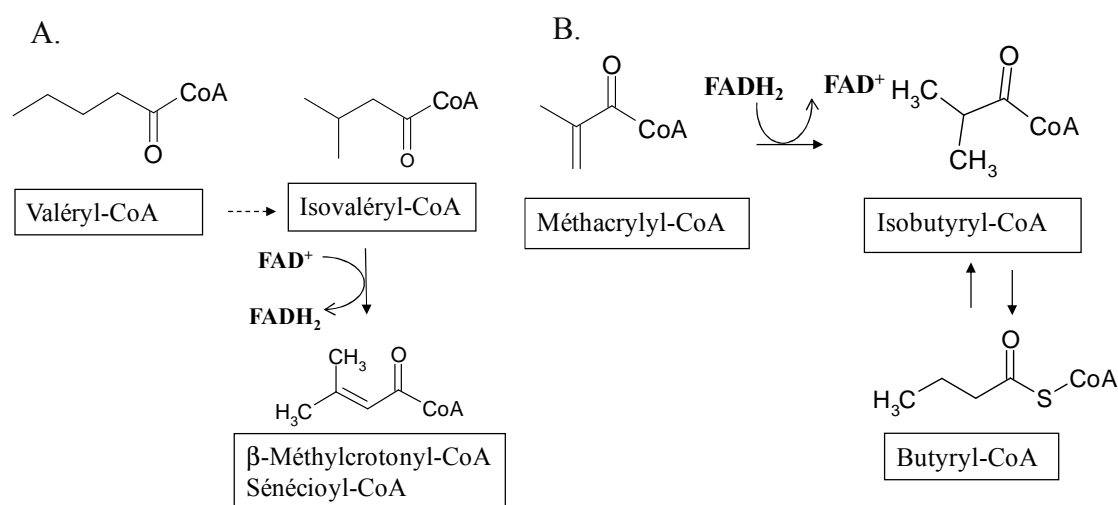


Figure I-12 Voies métaboliques potentielles pour la conversion des acides gras d'après Zhang *et al.* (1999). A. Conversion du valéryl-CoA en sénéciol-CoA – B. Conversion du méthacrylyl-CoA en butyryl-CoA.

I.4.4. Influence de l'ajout de précurseurs sur la production de nouvelles dithiopyrrolones

L'ajout d'acides organiques au milieu de culture de *Sa. algeriensis* a aussi entraîné la formation de dithiopyrrolones qui ne sont pas détectées en absence de ces acides organiques. Quatre nouvelles dithiopyrrolones ont notamment été isolées de cultures de *Sa. algeriensis* sur milieu SS supplémenté en acides organiques à 5 mM (Bouras *et al.* 2008). La valéryl-pyrrothine a été obtenue par l'ajout de l'acide organique directement précurseur de cette dithiopyrrolone: l'acide valérique. La benzoyl-pyrrothine et la formoyl-pyrrothine ont été synthétisées sur un milieu de culture supplémenté en acide benzoïque ou en acide cinnamique. La déméthyl-benzoyl-pyrrothine (ou benzoyl-holothine) a été produite en présence d'acide benzoïque. Ainsi, l'ajout de certains acides organiques (acide valérique, acide benzoïque) permet d'obtenir les dithiopyrrolones dont ils sont les précurseurs directs. La biosynthèse est dirigée par l'ajout des précurseurs dans le milieu. Il s'agit d'un procédé de contrôle de la production des métabolites secondaires et d'obtention de nouveaux métabolites bioactifs. Ce procédé aussi appelé PDB pour « precursor-directed biosynthesis » a déjà été mis en œuvre pour la production de différents analogues de métabolites secondaires. Cette

méthode a notamment été utilisée pour la synthèse de différents fluoroindolocarbazoles par *Saccharothrix aerecolonigenes* (Lam *et al.* 2001) ou d'actinomycines par des espèces de *Streptomyces* (Yajima *et al.* 1975).

Cependant, les travaux de Bouras *et al.* (2008) montrent aussi les limites de ce procédé de direction de la biosynthèse par les précurseurs. En effet l'ajout de tous les acides organiques ne mène pas à la production de la dithiolopyrrolone correspondante. A titre d'exemple, l'ajout d'acide cinnamique ne permet pas la production de la cinnamoyl-pyrrothine.

I.5. Les acyltransférases

I.5.1. Nomenclature

Les acyltransférases (EC 2.3) sont des enzymes qui catalysent le transfert du groupement acyl- d'un composé « donneur » vers un composé « accepteur ». Ce transfert est souvent associé avec la formation d'une liaison ester ou amide (excepté EC 2.3.3). Dans la nomenclature officielle ces enzymes sont nommées suivant le schéma : « donneur:accepteur groupetransférase » mais les noms formés de la façon suivante sont aussi acceptés : « accepteur groupetransférase » ou « donneur groupetransférase ». Les acyltransférases forment trois sous-classes. Les aminoacyltransférases (EC 2.3.2) et les enzymes qui catalysent la conversion du groupement acyl- en alkyl- au cours du transfert (EC 2.3.3) font l'objet de sous-classes spécifiques. Les autres acyltransférases sont regroupées dans la sous-classe EC 2.3.1. (IUBMB, [en ligne]).

Les enzymes de biosynthèse des acides gras, les « Fatty Acid Synthases » (FAS), et les enzymes de biosynthèse des polycétones, les « Polyketide Synthases » (PKS), de type I peuvent par ailleurs posséder des domaines catalytiques acyltransférases et même plus précisément des domaines acétyl/malonyltransférase (MAT).

I.5.2. Fonctions métaboliques

Les acyltransférases ont des fonctions métaboliques très variées. Certaines acyltransférases comme la citrate synthase (EC 2.3.3.1, Gottschalk 1969) participent au métabolisme carboné central. D'autres sont présentes dans le métabolisme des acides aminés. A titre d'exemple, la N-acétylglutamate synthase participe à la synthèse de l'arginine (EC

2.3.1.35, Marvil and Leisinger 1977). Elles sont aussi largement impliquées dans le métabolisme des lipides. Les acétyl/malonyl transférases, MAT, catalysent le transfert des groupements malonyl ou acétyl vers les protéines porteuses de groupements acyls, les « Acyl Carrier Protein » ou ACP au cours de la synthèse des acides gras (Ruch and Vagelos 1973). Les acyltransférases interviennent également dans la synthèse des céramides (Sribney *et al.* 1966), des cholesteryl esters (Carlos *et al.* 2005) et des triacylglycérols (Stöveken *et al.* 2005). Les carnithine acyltransférases jouent un rôle dans le transport des lipides au sein de la mitochondrie (Farrel *et al.* 1984). Par ailleurs, chez les mammifères, les acyltransférases jouent un rôle de détoxification en transférant les acides organiques sur des acides aminés (Nandi *et al.* 1977, Van der Westhuizen *et al.* 2000). Les histones acétyltransférases catalysent aussi l'acétylation des histones sur leurs résidus lysines. Cette acétylation joue un rôle dans l'activation de la transcription (Tanner *et al.* 2000).

De plus, les acyltransférases interviennent dans le métabolisme secondaire. Elle participe à la synthèse de nombreuses molécules bioactives comme l'anticancéreux taxol (Walker *et al.* 2002), la pénicilline G (EC 2.3.1.164, Tobin *et al.* 1990) ou la céphalosporine C, dans une dernière étape d'acétylation de la desacétocéphalosporine (Gutierrez *et al.* 1992). Enfin, l'acylation enzymatique des antibiotiques engendre souvent leur inactivation. Ce mécanisme de résistance aux antibiotiques est largement répandu. Il intervient notamment dans les résistances au chloramphénicol (Zaidenzaig *et al.* 1979) et aux aminoglycosides (Shaw *et al.* 1993).

I.5.3. Méthodes de dosage

Il existe de nombreuses méthodes pour doser les réactions enzymatiques acyltransférases. La plupart sont spécifiques d'une réaction enzymatique donnée car elles sont basées sur le dosage du substrat accepteur ou du produit de la réaction. Cependant, certaines méthodes s'appliquent de manière générale aux réactions acyltransférases qui catalysent le transfert d'un groupement acyl- d'un acyl-coenzyme A vers une molécule acceptrice. Ces méthodes sont basées sur le dosage du CoASH libéré par la réaction. Les groupements -SH réagissent avec certains réactifs (dithiols) ce qui entraîne la formation d'un composé chromogénique dosé ensuite par spectrophotométrie. L'aldithiol-4 et le réactif d'Ellman peuvent être utilisés (Williams and Northrop 1978, Scarbrough *et al.* 1979, Radika and

Northrop 1984). Dans ce cas, la réaction est suivie par mesure de l'absorbance à 324 nm et 412 nm respectivement.

I.5.4. Les N-acétyltransférases qui ressemblent au facteur GCN5 (les GNAT)

I.5.4.1. Historique et présentation

Parmi les N-acétyltransférases, les N-acétyltransférases apparentées à la protéine GCN5 forment une superfamille, la famille GNAT, qui inclut notamment des aminoglycosides N-acétyltransférases, la sérotonine N-acétyltransférase, la glucosamine-6-phosphate N-acétyltransférase, les histones acétyltransférases, la mycothiol synthase, la N-myristoyltransférase et la famille Fem des aminoacyltransférases. Toutes ces enzymes transfèrent le groupement acyl- d'un acyl-CoA vers l'amine primaire de différentes molécules acceptrices. Cette famille s'est constituée autour de quelques aminoglycosides acétyltransférases. Les gènes codant pour ces enzymes ont montré quatre motifs protéiques conservés bien qu'ils aient une faible similarité de séquences lorsqu'ils sont comparés deux à deux. De plus, ces gènes ont montré une homologie de séquence avec les facteurs de transcription eucaryotes, le premier étant le facteur GCN5 chez la levure qui possède aussi une activité histone acétyltransférase. C'est ainsi qu'a été créée la famille GNAT. Depuis, les analyses bioinformatiques ont permis d'identifier quelques 10000 protéines appartenant à la GNAT dans tous les règnes du vivant (Neuwald and Landsman 1997, Vetting *et al.* 2005). Elles sont regroupées dans la base de données Pfam sous le numéro d'accèsion PF00583. (Pfam, [en ligne]).

I.5.4.2. Des motifs protéiques conservés

Les enzymes appartenant à la GNAT possèdent jusqu'à 4 régions (motifs) conservées (si on considère la séquence primaire) et qui s'étendent sur 100 résidus. Ces motifs nommés de A à D sont observés dans l'ordre C-D-A-B dans la séquence. Ces régions ne permettent pas pour autant de déterminer des séquences protéiques consensus car les séquences protéiques ont souvent un faible pourcentage d'identité lorsqu'elles sont comparées deux à deux. Par ailleurs toutes les enzymes de la GNAT ne possèdent pas l'ensemble des motifs et le motif A semble le plus universellement conservé (Neuwald and Landsman 1997). Il pourrait être

impliqué dans la liaison de l'acétyl-CoA (plus rarement d'autres acyl-CoA), substrat commun à toutes ces enzymes.

1.5.4.3. Structure

L'étude de la structure de quelques membres de la GNAT montre que ces enzymes présentent une grande similarité structurale. Elles présentent généralement une structure secondaire constituée d'un feuillet N-terminal ($\beta 1$), suivi de deux hélices ($\alpha 1$, $\alpha 2$), trois feuillets anti-parallèles ($\beta 2$ à $\beta 4$), une hélice centrale ($\alpha 3$) et enfin d'un repliement $\beta 5$ - $\alpha 4$ - $\beta 6$ (Vetting *et al.* 2005). Le motif A montre un repliement particulièrement conservé. Il s'étend de $\beta 4$ à $\beta 5$ et les études structurales (tout comme les études par mutagenèse) confirment son rôle dans la liaison à l'acétyl-coA (plus rarement un autre acyl-CoA comme le myristoyl). En effet, l'acétyl-coA se glisse parfaitement dans le sillon en forme de V dessiné par les feuillets $\beta 4$ et $\beta 5$ (Sternglandz and Schindelinz 1999, Pourreza *et al.* 2005) (Figure I-13).



Figure I-13 Structure de l'aminoglycoside 6' N-acétyltransférase type II d'*Enterococcus faecalis* en complexe avec l'acétyl-CoA. Les acides aminés du motif A sont colorés en gris foncé et la molécule d'acétyl-CoA est montrée en noir. Issu de Pourreza *et al.* (2005), d'après Wybenga-Groot *et al.* (1999).

1.5.4.4. Mécanisme réactionnel

Pour une grande partie des GNAT, la réaction enzymatique se déroule de la manière suivante. L'acyl-CoA et la molécule acceptrice se lient à l'enzyme pour former un complexe ternaire. Une fois ce complexe formé, il y a une attaque nucléophile de l'amine de la molécule acceptrice sur le carbone de la liaison thioester de l'acyl-CoA, puis, libération du CoASH.

Parfois, la réaction peut être facilitée par une catalyse acide (l'attaque nucléophile est favorisée par la formation d'un carbocation au niveau de la liaison thioester), par une catalyse basique (l'attaque est favorisée par la déprotonation de la fonction amine, Trievel *et al.* 1999), ou par les deux (Vetting *et al.* 2005).

CHAPITRE II

Matériel et méthodes

Chapitre II. Matériel et méthodes

II.1.Appareillage et produits chimiques

Les principaux appareils utilisés sont décrits ci-dessous. L'ensemble de l'appareillage et des produits chimiques utilisés est détaillé en Annexe 1.

Les analyses par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) sont réalisées sur un système Bio-Tek Instruments (Milan, Italie) composé d'un injecteur automatique 465 muni d'une boucle d'injection de 80 μ L, d'un dégazeur, d'un système de pompe 525, d'un détecteur UV-vis 545V à barrette de diode et d'un four thermostaté 582. Le contrôle du système, la récupération et l'intégration des données sont réalisés par l'intermédiaire d'un ordinateur équipé avec le logiciel d'exploitation et d'analyse Kroma 3000 (Bio-Tek Instruments, Milan, Italie). Toutes les analyses sont réalisées en phase inverse sur une colonne ProntoSIL 120-5-C₁₈ SH, 150 \times 4.6 mm (Bischoff chromatography, Leonberg, Germany) complétée en amont par une pré-colonne 10 \times 4 mm.

Lors des analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), la chromatographie liquide est effectuée sur un système Agilent 1100 composé d'un injecteur automatique, d'un système de pompe et d'un détecteur UV-vis. Toutes les analyses sont réalisées en phase inverse sur une colonne ProntoSIL 120-5-C₁₈ SH, 150 \times 4.6 mm (Bischoff chromatography, Leonberg, Germany). Le spectre de masse est ensuite déterminé avec un appareil Q TRAP (Applied biosystem) muni d'un triple quadripôle.

Les étapes de chromatographie préparative basse pression sont réalisées avec le BioLogic LP System 220 V (Bio-Rad, Hercules, Californie, Etats-Unis) associé à un collecteur de fraction modèle 2110 (Bio-Rad). Le système est piloté par une unité de contrôle et est composé d'une pompe péristaltique, d'une valve d'injection munie d'une boucle d'injection d'1 mL, d'un mélangeur, d'un détecteur UV, d'une cellule de mesure de la conductivité et d'une valve SV-3 de dérivation. La totalité du système chromatographique est placé dans une armoire (Liebherr, Bulle, Suisse, modèle LKPv 6522) qui permet de thermostatier l'ensemble du système, les tampons d'élution et les fractions à récupérer. La récupération des données est réalisée par l'intermédiaire d'un ordinateur équipé avec le logiciel d'exploitation LP data view (Bio-Rad).

Un appareil HPLC semi-analytique (Waters, Milford, Massachusetts, USA) est aussi utilisé. Il est constitué d'une vanne d'injection manuelle, d'un système de pompe, d'une unité de contrôle Waters 600 controller, d'un détecteur UV Dual λ Absorbance detector. Les données sont récupérées à l'aide d'une table traçante. La colonne semi-préparative utilisée est une colonne C18 Uptisphere ODB 5 (250 x 7,8 mm) de chez Interchim (Montluçon, France).

II.2. Microorganisme

Sa. algeriensis NRRL B-24137 (= DSM 44581) est utilisée dans cette étude.

II.3. Cultures microbiennes

II.3.1. Milieux de culture

II.3.1.1. ISP2

Les cultures solides de *Sa. algeriensis* sont réalisées sur milieu ISP2 (International *Streptomyces* Project 2) préconisé par Shirling et Gottlieb (1966) pour la croissance et la sporulation des actinomycètes. Ce milieu est composé (par litre d'eau distillée) de 4 g d'extrait de levure, 10 g d'extrait de malt, 4 g de D-glucose et de 18 g d'agar. Le pH est ajusté à 7 avec du NaOH 2N avant autoclavage 20 min à 120 °C.

II.3.1.2. Milieu semi-synthétique basal (SS)

Les études physiologiques sont réalisées sur un milieu semi-synthétique (SS) mis au point dans le laboratoire pour la croissance et la production des dithiolopyrrolones (Bouras *et al.* 2006a). 1L de ce milieu de culture est constitué de 100 mL de solution A et de 900 mL de solution B.

Solution A:

D(+) Glucose anhydre (Acros)	15 g
Eau distillée	100 mL q.s.p

Solution B:

(NH ₄) ₂ SO ₄ (Prolabo)	2 g
NaCl (Sigma)	2 g
KH ₂ PO ₄ (Acros)	0.5 g
K ₂ HPO ₄ (Acros)	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O (Acros)	0.2 g (0.81 mM)
Extrait de levure (Difco)	2 g
CaCO ₃ (Merck)	5 g
Eau distillée	900 mL q.s.p

Le pH de la solution B est ajusté à 7 avec du NaOH 2N. Les deux solutions sont autoclavées séparément 20 min à 120 °C. La solution A est ajoutée à la solution B après stérilisation.

II.3.1.3. Milieu semi-synthétique supplémenté en acides organiques

Pour étudier l'effet des acides organiques, ils sont ajoutés au milieu semi-synthétique (SS). Ils sont autoclavés séparément sous la forme d'une solution concentrée 10 x puis ajoutés stérilement au milieu de culture avant inoculation. L'effet des acides acétique et benzoïque sur la production des dithiolopyrrolones et sur l'expression enzymatique est étudié en ajoutant ces acides à 5 et 1,25 mM respectivement. L'influence de la concentration en acide organique sur le maximum d'expression enzymatique est étudiée en ajoutant l'acide benzoïque à 0, 0,5, 2,5 et 5 mM et l'acide acétique à 0, 2,5, 5 et 7,5 mM. Pour la synthèse enzymatique de nouvelles dithiolopyrrolones les acides laurique, palmitique et phénylacétique sont ajoutés à une concentration de 0,5 mM. Les acides laurique et palmitique sont ajoutés dans la solution B avant autoclavage en raison de leur faible solubilité dans l'eau.

II.3.2. Conditions de culture

II.3.2.1. Conservation de la souche

La souche est stockée sous forme de spores, conservées à 24 °C avec du glycérol à 25 % (v/v). Le stock de spores (banque de travail) est réalisé suivant le protocole décrit ci-dessous.

- Culture mère

Une culture liquide en milieu SS de 50 mL est réalisée dans un Erlenmeyer de 250 mL. Cette culture liquide estensemencée à partir de spores de *Sa. algeriensis* obtenues sur gélose inclinée (Institut Pasteur d'Alger, Algérie) et récupérées à l'aide d'une anse de platine. Elle est incubée 48 h à 30 °C sous une agitation de 240 RPM.

- Production de spores

Des boîtes de Pétri contenant 30 mL d'ISP2 sontensemencées avec 100 µL de culture mère. Après étalement de l'inoculum au râteau, les cultures solides sont incubées 7 jours à 30 °C.

- Récupération et stockage des spores

5 mL d'une solution de Tween 80 à 0,1 % sont ajoutés dans les boîtes de Pétri. Les spores sont grattées à l'aide d'un râteau et récoltées dans la solution de Tween. Une solution de glycérol à 50 % v/v (dans l'eau distillée) est ajoutée à la suspension de spores de manière à atteindre une concentration finale en glycérol de 25 % v/v. Le mélange est vortexé et réparti dans des cryotubes. Les tubes sont conservés à -24 °C.

- Comptage des spores

Après 24 h de congélation à -24 °C, un cryotube est décongelé. Des dilutions successives au 1/10 de la suspension de spores sont réalisées dans du bouillon tryptone sel jusqu'à la dilution 10^{-12} . Les dilutions 10^{-6} à 10^{-12} sontensemencées en double sur boîtes d'ISP2 en étalant 0,1 mL de la suspension en surface avec un râteau. Les boîtes sont incubées 7 jours à 30 °C. Les colonies sont dénombrées sur les boîtes comportant 30 à 300 colonies. Le nombre de spores est exprimé en Unités Formant Colonies (UFC) par mL.

II.3.2.2. Pré-cultures

- Pré-culture sur milieu solide

Des boîtes de Pétri contenant environ 30 mL d'ISP2 sontensemencées avec 50 µL du stock de spores, c'est-à-dire 2×10^7 UFC. L'inoculum est étalé sur la boîte à l'aide d'un râteau puis les boîtes sont incubées dans une étuve à 30 °C pendant 7 jours.

- Pré-culture liquide

Les pré-cultures liquides sont réalisées dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de milieu SS. Chaque Erlenmeyer estensemencé avec les spores récupérées à partir d'une pré-culture sur milieu solide à l'aide d'une anse de platine. Les Erlenmeyers sont incubés à 30 °C et sous une agitation de 240 RPM pendant 48 h.

II.3.2.3. Cultures

Des Erlenmeyers de 500 mL contenant du milieu SS ou SS supplémenté en acide organique sontensemencés avec un volume de pré-culture égal à 10 % du volume utile (volume de milieu). Les cultures sont incubées à 30 °C sous une agitation de 240 RPM. Lors de la production de la pyrrothine et des études physiologiques, le volume utile de culture dans chaque Erlenmeyer est de 100 mL. Lors de la production de biomasse nécessaire à la purification de l'activité pyrrothine N-acyltransférase, le volume utile de culture dans chaque Erlenmeyer est de 150 mL.

II.3.3. Méthodes analytiques

4 mL de milieu sont régulièrement prélevés au cours des cultures de *Sa. algeriensis* pour réaliser le suivi de la biomasse et de la production des dithiolopyrrolones. La biomasse est déterminée par la mesure du poids sec et les dithiolopyrrolones sont quantifiées dans le surnageant de culture par HPLC.

II.3.3.1. Quantification de la biomasse: mesure du poids sec

Les poids secs sont déterminés suivant la méthode de Pfefferle *et al.* (2000) avec quelques modifications comme décrit par Bouras *et al.* (2006a). Des Eppendorfs sont séchés à 105 °C pendant 24 h, refroidis dans un dessiccateur et pesés (Pi). 4 mL de culture (Vp) sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 16000 g dans les Eppendorfs pré-pesés. Le surnageant est écarté et conservé pour la quantification des dithiolopyrrolones. Le culot cellulaire est lavé trois fois à l'HCl (0,35 N) puis une fois à l'eau distillée pour éliminer le CaCO₃. Les tubes Eppendorfs contenant le culot sont séchés à 105 °C pendant 24 h, refroidis dans un dessiccateur et pesés (Pf). Le poids secs est déterminé suivant l'Équation 1. Le résultat est exprimé en g L⁻¹.

$$\text{Matière Sèche (g L}^{-1}\text{)} = \frac{Pf \text{ (g)} - Pi \text{ (g)}}{Vp \text{ (L)}}$$

Équation 1 Détermination de la masse sèche : Pi, poids initial ; Pf, poids final ; Vp, volume du prélèvement.

II.3.3.2. Quantification des dithiolopyrrolones dans le milieu de culture

- Extraction des dithiolopyrrolones

3,2 mL de surnageant de culture sont extraits deux fois avec 1,6 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées et évaporées sous pression réduite (20 mbar) dans un speed-vac dont la température est maintenue en dessous d'une température de 40 °C. Les extraits secs récupérés sont solubilisés dans 0,8 mL de méthanol (grade HPLC). Les extraits concentrés sont ensuite filtrés sur des filtres seringue en PVDF (seuil 0,45µm, Ø 4 mm) et les filtrats sont transférés dans des flacons HPLC en verre (vials). Les vials sont conservés à - 24 °C jusqu'à l'analyse par HPLC.

- Analyse HPLC : méthode « DTPs extracellulaires »

La Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) est utilisée pour la quantification des dithiolopyrrolones (DTPs) dans le milieu de culture.

La phase mobile est composée d'un mélange eau ultrapure/acétonitrile (grade HPLC). Les analyses sont réalisées à un débit de 0,8 mL min⁻¹ et la colonne est thermostatée à 30 °C. Les dithiolopyrrolones sont détectées et quantifiées en UV à 390 nm. 80 µL d'extrait,

préparés comme décrit ci-dessus, sont injectés. La méthode utilisée est décrite dans le Tableau II-1. L'appareillage utilisé est présenté dans le paragraphe II.1, p. 58.

Dans ces conditions d'analyse les temps de rétention de la thiolutine et de la benzoyl-pyrrothine sont de 12,6 min et 18,83 min respectivement. En effet, les spectres UV obtenus à $T_r = 12,6$ min et 18,83 min sont en accord avec ceux décrits dans la littérature pour la thiolutine (Lamari *et al.* 2002a) et la benzoyl-pyrrothine (Bouras *et al.* 2008) respectivement.

Tableau II-1 Méthode HPLC « DTPs extracellulaires » utilisée pour l'analyse des dithiopyrrolones

	Temps (min)	Solvant A: CH ₃ CN en %	Solvant B: H ₂ O en %
Pré-run	-7	0	100
	0	0	100
Run	0	0	100
	5	30	70
	30	100	0
Post-run	30	100	0
	32	0	100

- Quantification des dithiopyrrolones

Une courbe d'étalonnage est réalisée pour la thiolutine en analysant différents standards de thiolutine à 1, 2, 5, 10, 20, 40 et 60 mg L⁻¹ préparés dans un mélange H₂O/CH₃CN 50:50 v/v à partir d'une solution mère à 60 mg L⁻¹ (1,3 mg de thiolutine q.s.p. 20 mL de mélange H₂O/CH₃CN 50:50 v/v). La synthèse biologique du standard de thiolutine est décrite en Annexe 2. Le coefficient de réponse de la thiolutine est déterminé à partir de l'analyse en double de deux gammes distinctes. Celui-ci est régulièrement réévalué pour tenir compte du vieillissement de la lampe UV. A titre indicatif, l'étalonnage réalisé en Février 2009 avec la méthode « DTPs extracellulaires » a permis de déterminer un coefficient de réponse pour la thiolutine de 26890 $\mu\text{V} \cdot \text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ +/- 8,4 %.

Ce coefficient de réponse est utilisé pour la quantification de la thiolutine dans les extraits. Comme la thiolutine et les autres dithiopyrrolones ont des coefficients d'extinction molaires très proches ($\epsilon_{390 \text{ nm}} = 8317\text{-}9333 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Lamari *et al.* 2002a), cette même courbe étalon est utilisée pour quantifier l'ensemble des dithiopyrrolones et en particulier la benzoyl-pyrrothine.

II.4.Synthèse de la pyrrothine par voie semi-biologique

II.4.1. Production microbiologique des dithiopyrrolones

Des cultures de *Sa. algeriensis* (14,2 L) sont réalisées en Erlenmeyers de 500 mL (cf. II.3.2, p. 61) sur milieu SS supplémenté en acide humique à 1 g L⁻¹ pendant 96 h. La biomasse est éliminée par centrifugation 15 min à 5000 g. Le surnageant de culture (12,9 L) est récupéré pour l'extraction des dithiopyrrolones.

II.4.2. Extraction des dithiopyrrolones

Le surnageant de culture est extrait trois fois au dichlorométhane (1:0,3 v/v). Les traces d'eau sont ensuite éliminées de la phase organique par ajout de sulfate de sodium anhydre puis le sel est séparé de la phase organique par filtration sur un filtre de nylon (φ 47 mm, seuil de 0,2 µm). La phase organique anhydre est enfin évaporée sous pression réduite dans un rotavapor, à une température maintenue inférieure à 40 °C. L'extrait est conservé à -24 °C jusqu'à l'hydrolyse.

II.4.3. Hydrolyse acide

Une hydrolyse acide ménagée est réalisée pour obtenir la pyrrothine à partir des dithiopyrrolones comme breveté par Pfizer and co (1956) avec quelques modifications. L'hydrolyse est réalisée dans un système bi-phasique HCl/dioxane 1:5 v/v à reflux pendant 30 ou 60 minutes à une température comprise entre 50 et 100 °C. 100 mg d'extrait sont hydrolysés dans 6 mL de milieu réactionnel. Ensuite, le mélange réactionnel est refroidi d'abord à température ambiante puis dans la glace. Il est enfin évaporé à sec dans un rotavapor à une température maintenue inférieure à 60 °C. L'extrait sec est solubilisé dans le méthanol dans les proportions suivantes : 3,5 mg d'extrait sec par mL de méthanol. 5 mL de la solution méthanolique sont filtrés sur un filtre en PVDF (0,2 µm) pour analyses. L'hydrolysate, filtré et non filtré est conservé à -24 °C.

II.4.4. Mise en évidence de la pyrrothine

II.4.4.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

L'hydrolysate a d'abord été analysé par CCM.

Les échantillons sont déposés sur des plaques CCM en aluminium, d'épaisseur 0,2 mm en silice F254. L'élution est réalisée avec un mélange Chloroforme/Méthanol 9:1 v/v (solvants grade HPLC). Les échantillons suivants sont déposés : 40 µL de standard de thiolutine à 60 mg L⁻¹ dans H₂O/CH₃CN 50:50 v/v (S) et 20 µL d'hydrolysate (H). Les dépôts sont réalisés en double (dépôts A et B).

Les dépôts A (demi-plaque A) sont observés sous UV à 254 nm. Dans ces conditions la silice fluoresce tandis que les composés apparaissent sous forme de tâches sombres.

Les dépôts B (demi-plaque B) sont révélés à la ninhydrine. La plaque est pulvérisée de ninhydrine à 0,5 % dans le butanol puis séchée au sèche-cheveux. La réaction de la ninhydrine avec les fonctions amines libres est activée par chauffage de la plaque à environ 100 °C pendant 3 minutes sur une plaque chauffante. Les tâches correspondant à un composé présentant une fonction amine libre se colorent en violet (ils sont ninhydrine +). La thiolutine ne présente pas d'amine libre et est donc ninhydrine -. La pyrrothine présente une amine libre et est donc ninhydrine +. Seules les tâches colorées ou ninhydrine + apparaissent sur la demi-plaque B.

II.4.4.2. Analyse HPLC : méthode « détection pyrrothine »

La présence de pyrrothine dans l'hydrolysate est également vérifiée par HPLC.

La phase mobile est composée d'un mélange d'eau ultrapure et d'acétonitrile (grade HPLC). Les analyses sont réalisées à un débit de 0,8 mL min⁻¹ et la colonne est thermostatée à 30 °C. Les dithiopyrrolones sont détectées et quantifiées en UV à 390 nm. 30 µL d'hydrolysate, préparés comme décrit paragraphe II.4.3 p. 65., sont injectés. La méthode utilisée est décrite dans le Tableau II-2. L'appareillage utilisé est présenté dans le paragraphe II.1, p. 58.

Dans ces conditions d'analyse les temps de rétention de la pyrrothine et de la thiolutine sont de 8,3 min et 9,85 min respectivement. Les spectres UV obtenus à Tr = 8,3 min et 9,85 min sont en accord avec ceux décrits dans la littérature pour la pyrrothine (Pfizer and co 1956) et la thiolutine (Lamari *et al.* 2002a) respectivement.

Tableau II-2 Méthode HPLC « Détection pyrrothine » utilisée pour la détection de la pyrrothine dans l'hydrolysate.

	Temps (min)	solvant A: CH ₃ CN en %	solvant B: H ₂ O en %
Pré-run	-7	20	80
	0	20	80
Run	0	20	80
	30	50	50
	35	100	0
Post-run	35	100	0
	37	0	100

II.4.5. Purification par chromatographie sur couche épaisse (CCE)

Pour la préparation de 5 plaques de 0,5 mm d'épaisseur, 60 g de silice sont mélangés avec 120 mL d'eau distillée. La silice est étalée à l'aide de l'étaleur sur des plaques de verre (20 x 20 cm). Une fois sèches, les plaques sont activées 1 h à 100 °C.

400 µL d'hydrolysate (3,5 mg d'extrait mL⁻¹ de méthanol) sont déposés en trait à 2.5 cm du bord à l'aide d'une pipette de 10 µL sur 17 cm de large. La migration est effectuée dans 50 mL de solvant de migration, chloroforme/méthanol 9:1 v/v. Le front d'élution migre sur 16,5 cm.

Les plaques sont grattées au niveau de la première (Rf variant de 0,5 à 0,6, H1) et de la 2^{ème} bande jaune (Rf variant de 0,67 à 0,77, H2). La silice récupérée est mise à désorber dans 40 mL de méthanol, sous agitation (240 RPM), dans des erlenmeyers de 250 mL pendant 2 h 30. La silice est éliminée par filtration sur papier Whatman qualitatif puis sur filtre seringue PVDF (seuil de 0,2 µm). Le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite au rotavapor à une température maintenue inférieure à 40 °C. Ensuite, l'extrait sec est solubilisé dans 400 µL de méthanol.

Pour évaluer la purification, l'extrait concentré est alors filtré sur un filtre seringue 0,2 µm, déposé dans un vial puis analysé par HPLC suivant la méthode « Détection pyrrothine » présentée en II.4.4.2, p. 66.

II.4.6. Purification par HPLC semi-analytique

II.4.6.1. Réalisation

L'étape de purification de la pyrrothine dans l'hydrolysate par chromatographie en phase inverse est effectuée sur une HPLC semi-analytique (appareillage décrit dans le paragraphe II.1, p. 58). La phase mobile est composée d'un mélange eau ultrapure/acétonitrile (grade HPLC). La chromatographie est réalisée à un débit de 2 mL min⁻¹. Le suivi chromatographique est réalisé par détection UV à 220 nm. Chaque pic détecté en UV est collecté dans un tube à hémolyse en verre. 150 µL d'hydrolysate sont injectés. La méthode utilisée est décrite dans le Tableau II-3.

Tableau II-3 Méthode HPLC « Purification pyrrothine » utilisée pour la purification de la pyrrothine par HPLC semi-analytique.

Temps	solvant A:	solvant B:
	CH ₃ CN en %	H ₂ O en %
0	20	80
45	35	65
50	50	50
51	100	0
56	100	0
57	20	0

II.4.6.1. Evaluation de la purification par HPLC analytique

Les fractions récoltées sont séchées par évaporation sous un jet d'air puis resuspendues dans 150 µL de méthanol (grade HPLC) et numérotées suivant leur ordre de récupération (temps de rétention de F1 < temps de rétention de F2). Elles sont ensuite analysées par HPLC analytique suivant la méthode « Détection pyrrothine » présentée en II.4.4.2, p. 66. Le volume d'injection varie de 30 à 60 µL.

II.5.Synthèse de la pyrrothine par voie chimique

Les solvants (CH_2Cl_2 , Et_3N , EtOH , heptane, THF, cyclohexane, AcOEt , MeOH , Et_2O et TFA) sont séchés sur tamis 4 Å. Les autres produits chimiques, obtenus de source commerciale, sont utilisés sans purification. Les analyses RMN ^1H sont réalisées au Laboratoire de Chimie de Coordination (Toulouse, France) sur un spectromètre Bruker DPX 300. Les constantes de couplage sont données en hertz et les déplacements chimiques en ppm. Les spectres sont présentés en Annexe 3 et 4.

Avant de réaliser la synthèse de la pyrrothine, la synthèse chimique de l'holothine a d'abord été réalisée suivant le protocole de Hjelmgaard *et al.* (2007). Les différentes étapes sont décrites Figure II-1.

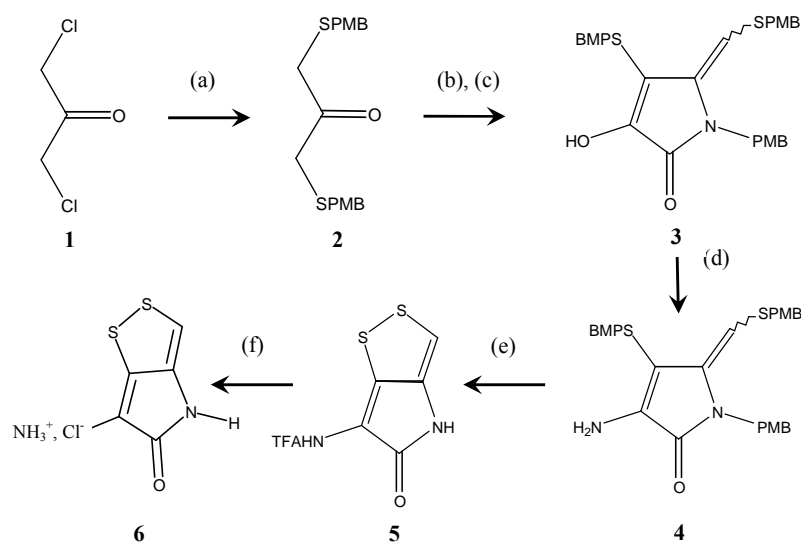


Figure II-1 Synthèse de l'holothine 6 – Etapes (a) méthoxyde de sodium (NaOMe , 2eq.), p-méthoxybenzylthiol (PMBS, 2eq.), éthanol, reflux, 100%, (b) p-méthoxybenzylamine (PMBNH_2 , 1eq.), Et_3N , THF, TiCl_4 , heptane, (c) chlorure d'oxalyle (2eq.), Et_3N , THF, 41,57 %, (d) Acétate d'ammonium, 150 °C, 58,2 %, (e) m-crésol (10 eq.), TFA, reflux, 41,09 %, (f) HCl(aq) , MeOH , reflux, 53,7%.

Quelques modifications ont été apportées au protocole de référence :

- A l'issue des réactions b) et c) le produit 3 n'est pas purifié par chromatographie flash mais lavé à l'acétate d'éthyle puis filtré. Le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite puis est de nouveau lavé par de l'acétate d'éthyle et filtré. Les deux précipités obtenus après filtration constituent le produit (3). Le rendement de l'étape est alors de 41,6 %. Le spectre RMN ^1H obtenu correspond à celui décrit dans la publication de référence. Il indique qu'il s'agit d'un mélange des deux isomères (iso A – iso B, 80:20).

- L'extrait sec obtenu après la réaction d) n'est pas purifié par chromatographie flash mais le produit (**4**) précipite lors d'un lavage à l'Et₂O de l'extrait sec. Le rendement de l'étape est de 58,2 %. Le spectre RMN ¹H obtenu correspond à celui décrit dans la publication de référence. Il indique qu'il s'agit d'un mélange des deux isomères (iso A – iso B, 80:20).
 - Le produit (**5**) est purifié sur colonne de gel de silice avec comme éluant un mélange cyclohexane/AcOEt 1:1 v:v.
 - Le produit (**6**), l'holothine, est récupérée par filtration du milieu réactionnel (f) après refroidissement à température ambiante. Le rendement de l'étape est de 53,7 %. La RMN ¹H effectuée sur le précipité récupéré correspond bien à la structure de l'holothine. δ_H (300 MHz, DMSO-d₆) : 10,85 (1H, s, NH-C=O cyclique), 7,17 (1H, s, C=CH), 3-4,6 (1H, s large, NH₃⁺). Le DMSO est ajouté extemporanément au produit pour l'analyse RMN.
- La synthèse de l'holothine a été réalisée avec un rendement global de 5,03 %.

La synthèse chimique de la pyrrothine a ensuite été réalisée suivant le même protocole de Hjelmgaard *et al.* (2007) avec quelques adaptations (Figure II-2).

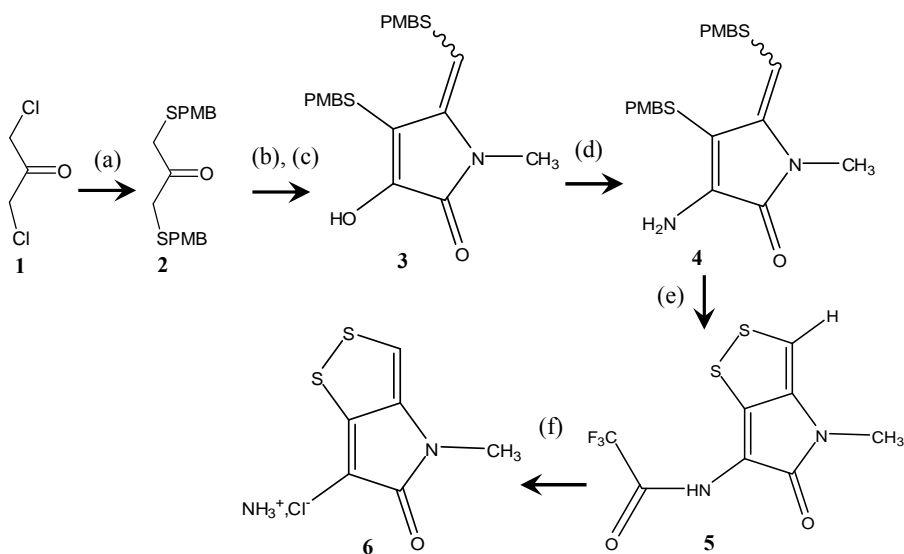


Figure II-2 Synthèse de la pyrrothine 6 – Etapes (a) méthoxyde de sodium (NaOMe, 2eq.), p-méthoxybenzylthiol (PMBS, 2eq.), éthanol, reflux, 100%, (b) méthylamine (MeNH₂), Et₃N, THF, TiCl₄, heptane, (c) chlorure d'oxalyle (2eq.), Et₃N, THF, 31,4%, (d) Acétate d'ammonium, éthanol, reflux, 53,6 %, (e) m-crésol (10 eq.), TFA, reflux, 42,3 %, (f) HCl(aq), MeOH, reflux, 49,6 %.

Cette fois, le groupement méthyle de l'azote cyclique est introduit lors de l'étape (b) en remplaçant la p-méthoxybenzylamine par de la méthylamine (Li *et al.* 2007). Les différentes étapes de la synthèse sont présentées sur la Figure II-2 et détaillées ci-dessous.

II.5.1. Réaction (a): formation de la 1,3-bis-(4-méthoxy-benzylsulfanyl)-propan-2-one (2).

Dans un erlenmeyer rodé, on introduit 3,38 g (62,6 mmol, 2 éq.) de NaOMe dissous dans 110 mL d'éthanol, et 8,80 mL (63,2 mmol) de p-méthoxybenzylthiol. Le mélange est agité à température ambiante sous azote pendant 10 minutes. 3,86 g (30,7 mmol) de 1,3-dichloroacétone sont alors ajoutés et le mélange est porté à reflux pendant 2 h. Après refroidissement à température ambiante, le mélange réactionnel est évaporé à sec sous pression réduite. Le produit obtenu est repris par 50 mL d'eau et 50 mL de CH₂Cl₂. Après décantation, la phase organique est récupérée. La phase aqueuse est extraite avec deux fois 50 mL de CH₂Cl₂. Les trois phases organiques récupérées sont rassemblées, séchées sur du Na₂SO₄ puis évaporées à sec sous pression réduite. Le produit **2** obtenu sous forme d'un solide blanc pur (11,14 g, 30,71 mmol, 100 %) est utilisé pour l'étape suivante sans étape de purification supplémentaire. En effet, la RMN ¹H est en accord avec la structure du produit **2** :

δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 7,36 (4H, d, J = 8,7), 6,97 (4H, d, J = 8,7), 3,93 (6H, s, O-CH₃), 3,78 (4H, s, SCH₂), 3,38 (4H, s, CH₂).

R_f (cyclohexane/AcOEt 1:1) = 0,56

F °C = 74 °C

II.5.2. Réaction (b) et (c): formation de la 3-hydroxy-4-(4-méthoxybenzylsulfanyl)-5-[(4-méthoxybenzylsulfanyl)méthylidène]-1-méthyl-1H-pyrrol-2(5H)-one (3, iso A et iso B).

Une solution de **2** (11,42 g, 31,5 mmol), de méthylamine (25 mL, 49,68 mmol) (en solution à 10 % v/v dans le benzène) et d'Et₃N (8,8 mL, 63,2 mmol) est réalisée dans le THF (315 mL) dans un bicol placé dans la glace et sous azote. Une solution de TiCl₄ (2 mL, 18,24 mmol) dans l'heptane (47 mL) y est ajoutée pendant 25 minutes à l'aide d'une ampoule à addition. Le mélange est porté à reflux pendant 14 h puis refroidi à -10 °C et 2,7 mL (72,0 mmol) de chlorure d'oxalyle sont ajoutés. Une solution d'éthyl amine (8,8 mL, 63,2 mmol) dans le THF (325 mL) est ensuite ajoutée goutte à goutte pendant 30 minutes et

le mélange final est agité pendant 22 h. 250 mL d'Et₂O sont alors ajoutés au mélange réactionnel. Le mélange est filtré et le précipité est lavé avec 250 mL d'Et₂O. Le filtrat est lavé avec deux fois 250 mL d'eau distillée et les phases aqueuses combinées sont extraites avec 250 mL d'Et₂O. Les phases organiques (3 x 250 mL d'Et₂O) sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄ puis évaporées à sec sous pression réduite. L'extrait sec ainsi obtenu est lavé deux fois à l'éther. Ces deux lavages successifs permettent de récupérer 4,23 g (9,85 mmol, 31,4 %) de **3** sous forme d'un précipité blanc. La RMN ¹H est en accord avec la structure du produit **3**. Il s'agit d'un mélange de deux isomères (iso A - iso B, 87:13).

δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 7,25-6,82 (8H, m), 6,27 (0,13 x 1H, s, C=CH, iso B), 5,99 (0,87 x 1H, s, C=CH, iso A), 3,93 (2H, s, SCH₂), 3,86 (2H, s, SCH₂), 3,83 et 3,80 (6H, 2s, OCH₃), 3,4 (3H, s, CH₃), 2,07 (1H, s, OH).

R_f (cyclohexane/AcOEt 1:1) = 0,35 (iso A majoritaire)

II.5.3. Réaction (d): formation de la 3-amino-4- (4-méthoxybenzylsulfanyl)-5-[(4-méthoxybenzylsulfanyl)-méthylidène]-1-méthyl-1H-pyrrol-2(5H)-one (**4**, iso A et iso B).

Le mélange de 1,5 g de (**3**) (3,5 mmol) et 54 g (70 mmol) d'acétate d'ammonium dans 30 mL d'éthanol est porté à reflux sous agitation pendant 24 h. Après refroidissement, 50 mL d'eau sont ajoutés. Le mélange réactionnel est filtré et les insolubles sont repris dans 260 mL de dichlorométhane. La phase organique est directement séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée à sec sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/AcOEt 9:1 puis 8:2. La structure de **4** (m= 800 mg, n= 1,88 mmol, 53,6 %) a été confirmée par RMN ¹H. Il s'agit d'un mélange de deux isomères (iso A- iso B, 68:32).

δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 7,34-6,76 (8H, m), 5,80 (0,68 x 1H, s, C=CH, iso A), 5,65 (0,32 x 1H, s, C=CH, iso B), 3,97 (0,32 x 2H, s, SCH₂, iso B), 3,91 (0,68 x 2H, s, SCH₂, isoA), 3,77-3,83 (6H, 7s, S-CH₂ et OCH₃), 3,57 (0,32 x 2H, s, NH₂, iso B), 3,41 (3H, s, CH₃), 3,08 (0,68 x 2H, s, NH₂, iso A).

R_f (Cyclohexane/AcOEt 1:1) = 0,32 et 0,44

II.5.4. Réaction (e): Formation du 2,2,2-trifluoro-N-(4-méthyl-5-oxo-4,5-dihydro-[1,2]-dithiolo-[4,3-b]-pyrrol-6-yl)-acétamide (5).

1,5 g (3,52 mmoles) de **4** et 3,95 mL (36,36 mmoles) de m-crésol sont dissous dans 70 mL de TFA à température ambiante et sous azote. Le mélange est porté à reflux pendant 22 h puis refroidi à température ambiante et évaporé à sec sous pression réduite. Le produit est purifié sur colonne de gel de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/AcOEt 7:3 puis 1:1 v/v. La RMN ^1H du produit isolé (420 mg, 1,49 mmoles, 42,33 %) est en accord avec la structure du produit **5**.

δ_{H} (CDCl_3) : 8,3 (1H, s, NH-C=O), 6,83 (1H, s, C=CH), 3,42 (1H, s, CH_3).

Rf ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1) = 0,6

II.5.5. Réaction (f): Formation de l'hydrochlorure de la 6-amino-4-méthyl-[1,2]-dithiolo-[4,3-b]pyrrol-5-one (6): la pyrrothine

1,1 mL d'HCl concentré sont ajoutés à une solution de 230 mg de **5** (0,816 mmoles) dans 30 mL de méthanol à température ambiante sous azote. Le mélange obtenu est porté à reflux 3 h. Après refroidissement à température ambiante, le mélange est filtré. Le précipité isolé (90 mg, 0,405 mmoles, 49,63 %) de couleur brun-orangé est caractérisé par RMN ^1H .

Le spectre obtenu est en accord avec la structure du produit **6**.

δ_{H} (DMSO-d_6) : 7,41 (1H, s, C=CH), 3,9-5,3 (1H, s large, NH_3^+), 3,27 (3H, s, CH_3).

En raison de l'instabilité du produit dans le DMSO, celui-ci est ajouté extemporanément au produit pour l'analyse RMN.

Rf ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1) = 0,52

Le spectre UV du pic majoritaire en HPLC, obtenu grâce à la détection UV avec un détecteur à barette de diode, est le suivant: λ_{max} (absorbance relative) 225 (0,39), 305 (0,55), 385 (1) dans un mélange eau/méthanol 87:13 v/v.

II.6. Préparation d'un extrait cellulaire de *Saccharothrix algeriensis* pour des études d'expression

II.6.1. Récupération et lavage de la biomasse

A l'arrêt de la culture, la biomasse est récupérée par centrifugation à 5000 g pendant 15 min. La biomasse est lavée deux fois à l'eau physiologique (0,9 % de NaCl) et une fois avec le tampon dans lequel est réalisée l'extraction (tampon de lyse), le tampon Tris-HCl 50 mM pH 8. Après le lavage dans le tampon de lyse, la suspension bactérienne est filtrée sous vide sur une membrane en acétate de cellulose (seuil 0,2 μ m) et la biomasse est récupérée sur le filtre.

II.6.2. Extraction des protéines

0,6 g de biomasse humide sont resuspendus dans 1 mL de tampon de lyse et la suspension est transférée dans un tube Fast Protein Blue. Deux cycles de disruption (30 sec, 5 m s⁻¹) sont réalisés dans un disrupteur Fast Prep. Entre les deux cycles, l'échantillon est conservé 5 min dans la glace. La matrice de lyse est écartée et l'échantillon est centrifugé à 10 000 g pendant 30 min pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant constitue l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis* NRRL B-24137. Les activités pyrrothine N-acyltransférases y sont déterminées immédiatement. Un échantillon est congelé à -80 °C pour le dosage ultérieur des protéines. Les échantillons sont toujours conservés dans la glace et les centrifugations sont réalisées à 4 °C.

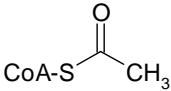
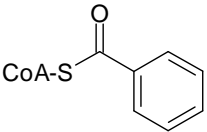
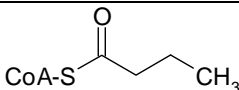
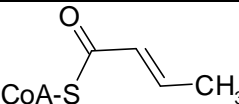
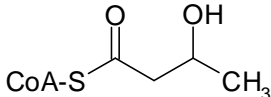
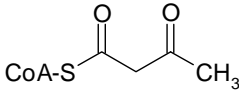
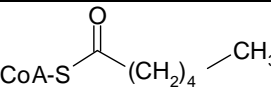
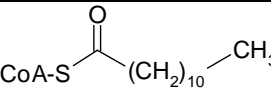
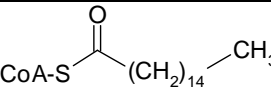
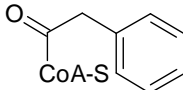
II.7. Test d'activité acyltransférase

II.7.1. Réaction enzymatique

Le milieu réactionnel contient dans l'ordre d'ajout 10 μ L de pyrrothine (solution à 10x dans le méthanol soit 556 mg L⁻¹ et 2,5 mM, conservée à -20 °C), 10 μ L d'acyl CoA (solution à 10x dans l'eau déionisée soit 5 mM, conservée à -20 °C), et 80 μ L d'extrait enzymatique dont l'ajout déclenche la réaction enzymatique (T0). Différents acyls-CoA ont été testés comme donneurs de groupements acyls. Ils sont présentés dans le Tableau II-4.

Le milieu réactionnel est incubé à 30 °C pendant un temps t (0, 5 et 10 min) puis la réaction est stoppée avec 20 µL de TCA 2,5 % w/v (réalisé dans l'eau bidistillée extemporanément). Enfin 60 µL de méthanol sont ajoutés. Le test est réalisé sur l'extrait brut non dilué ou dilué dans du tampon Tris HCl 50 mM, pH 8 de manière à observer une apparition linéaire du produit sur 10 min.

Tableau II-4 Description des acyls coenzyme A testés et nomenclature

Donneur	Accepteur	Réaction enzymatique <u>recherchée</u>	Nomenclature	Structure
Acétyl coenzyme A	Pyrrothine	Pyrrothine N-acétyltransférase	PY-AT	
	Holothine	Holothine N-acétyltransférase	HO-AT	
Benzoyl coenzyme A	Pyrrothine	Pyrrothine N-benzoyltransférase	PY-BT	
	Holothine	Holothine N-benzoyltransférase	HO-BT	
Butyryl coenzyme A	Pyrrothine	Pyrrothine N-butyryltransférase	PY-BUT	
Crotonoyl coenzyme A	Pyrrothine	Pyrrothine N-crotonoyltransférase	PY-CRO	
β- hydroxybutyryl coenzyme A	Pyrrothine	Pyrrothine N- hydroxybutyryltransférase	PY-OH-BUT	
Acétoacétyl coenzyme A	Pyrrothine	Pyrrothine N- acétoacétyltransférase	PY-ACETO	
Hexanoyl coenzyme A	Pyrrothine	Pyrrothine N-hexanoyltransférase	PY-HE	
Lauroyl coenzyme A	Pyrrothine	Pyrrothine N-lauroyltransférase	PY-LAU	
Palmitoyl coenzyme A	Pyrrothine	Pyrrothine N-palmitoyltransférase	PY-PA	
Phénylacétyl coenzyme A	Pyrrothine	Pyrrothine N- phénylacétyltransférase	PY-PHE	

II.7.2. Dosage du produit initialement présent dans les extraits

25 μL de TCA à 2,5 % w/v sont ajoutés à 100 μL d'extrait pour la quantification par HPLC des produits de la réaction enzymatique initialement présents dans l'extrait (thiolutine, benzoyl-pyrrothine ou autres) et ainsi permettre de quantifier la quantité de produit apparue après conversion enzymatique.

II.7.3. Dosage HPLC et LC-MS

II.7.3.1. Préparation de l'échantillon

Les échantillons sont centrifugés à 15000 g pendant 15 min à 4 °C puis les surnageants sont transférés dans un nouvel Eppendorf et conservés à -80 °C. Avant l'analyse, les échantillons sont de nouveau centrifugés à 15000 g pendant 15 min puis 120 μL de surnageant sont transférés dans un vial HPLC (avec insert moulé, volume de 200 μL en polypropylène) pour analyse.

II.7.3.1. Analyse HPLC : conditions analytiques

La phase mobile est composée d'un mélange eau ultrapure/méthanol (grade HPLC). Les analyses sont réalisées à un débit de 0,8 mL min⁻¹ et la colonne est thermostatée à 30 °C (sauf LC-MS). Les dithiolopyrrolones sont détectées et quantifiées en UV à 390 nm. 40 μL d'échantillon, préparés comme décrit ci-dessus, sont injectés. L'appareillage utilisé est présenté en II.1, p. 58. Le produit des réactions acétyltransférases est analysé avec la méthode « acétyltransférase » présentée en Tableau II-5.

Tableau II-5 Méthode d'analyse « acétyltransférase » utilisée pour la détection et la quantification des produits de la réaction enzymatique acétyltransférase.

	Temps (min)	solvant A: MeOH en %	solvant B: H ₂ O en %
Pré-run	-7	30	70
	0	30	70
Run	0	30	70
	17	47	53
Post-run	17	47	53
	19	100	0
	24	100	0
	25	30	70

Le produit des autres réactions acyltransférases est analysé avec la méthode « acyltransférase » présentée en Tableau II-6.

Tableau II-6 Méthode d'analyse « acyltransférase » utilisée pour la détection et la quantification des produits de la réaction enzymatique acyltransférase (autres que acétyltransférase).

	Temps (min)	solvant A: MeOH en %	solvant B: H ₂ O en %
Pré-run	-7	30	70
	0	30	70
Run	0	30	70
	15	45	55
	35	100	0
	37	100	0
Post-run	37	100	0
	39	30	70

Enfin les produits potentiels des réactions PY-LAU, PY-PA et PY-PHE sont aussi recherchés en analysant les échantillons suivant la méthode « acyltransférase longue » présentée en Tableau II-7.

Tableau II-7 Méthode d'analyse « acyltransférase longue» utilisée pour la détection et la quantification des produits des réactions enzymatiques PY-LAU, PY-PA et PY-PHE.

		solvant A: MeOH en %	solvant B: H ₂ O en %
Pré-run	-7	30	70
	0	30	70
Run	0	30	70
	15	45	55
	35	100	0
	60	100	0
Post-run	60	100	0
	62	30	70

Les dithiolopyrrolones sont quantifiées comme indiqué en II.3.3.2., paragraphe « Quantification des dithiolopyrrolones ».

II.7.3.2. Spectrométrie de masse

L'ionisation est réalisée par électrospray en mode positif. En ionisation par électrospray en mode positif, les ions observés peuvent être des ions quasimoléculaires créés par l'addition d'un proton, notés $[M+H]^+$ ou bien des ions créés par l'addition d'un autre cation comme un ion sodium, $[M+Na]^+$. Des ions multichargés, de type $[M+nH]^{n+}$ sont aussi fréquemment observés. M indique la masse moléculaire de la molécule analysée et n le nombre de charges portées par la molécule ionisée. Les ions formés sont caractérisés par leur ratio masse sur charge, m/z. Le spectre de masse indique les ions pour lesquels le ratio m/z est dans la fenêtre balayée, c'est-à-dire m/z 150 à 400.

II.7.4. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées dans l'extrait enzymatique suivant la méthode de Bradford (1976).

L'étalonnage est réalisé, en même temps que chaque dosage d'échantillons, à l'aide de solutions d'albumine sérique bovine (BSA) à 1, 2,5, 5, 7,5 et 10 mg L⁻¹. Les étalons sont

préparés dans le même tampon que l'échantillon (Tris-HCl 50 mM pH 8) à partir d'une solution mère de BSA à 1 g L⁻¹ conservée à -24 °C.

Les échantillons sont dilués dans le tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 jusqu'à ce que la concentration en protéines totales dans l'échantillon dilué soit incluse dans la gamme étalon (1 à 10 mg L⁻¹ eq. BSA). 1 mL d'échantillon correctement dilué (ou étalon) est mélangé à 1 mL de réactif (amené à température ambiante) directement dans les cuves spectrophotométriques. Le développement de la réaction se fait à température ambiante pendant 5 à 45 min. La lecture de l'absorbance est réalisée à 595 nm.

II.7.5. Expression de l'activité

Une unité enzymatique est définie comme l'activité enzymatique produisant 1 µmol de dithiolopyrrolone par minute. L'activité enzymatique spécifique est exprimée en µU mg⁻¹ de protéines. L'activité enzymatique est aussi exprimée en mU g⁻¹ de MS. Une valeur de 162 mg de protéines par g de matière sèche a été utilisée pour réaliser la conversion de l'U mg⁻¹ de protéines vers l'U g⁻¹ de MS. Le contenu protéique de la matière sèche a été déterminé de la manière suivante. La masse sèche et la concentration en protéines intracellulaires ont été déterminées chaque 24 h pendant 7 jours dans une culture de *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 sur milieu SS. La courbe indiquant la concentration en protéines en mg L⁻¹ en fonction de la MS en g L⁻¹ indique qu'il existe une corrélation linéaire entre les deux paramètres avec une pente de 162 mg de protéines g⁻¹ de MS ($R^2 = 0,91$).

Les activités enzymatiques sont mentionnées suivant la nomenclature présentée en Tableau II-4. Les activités enzymatiques pyrrothine N-acétyltransférase et pyrrothine N-benzoyltransférase sont aussi appelées plus simplement, « acétyltransférase » et « benzoyltransférase » respectivement.

II.8. Purification partielle des activités pyrrothine N-acyltransférases

II.8.1. Etapes de purifications

II.8.1.1. Préparation de l'extrait cellulaire par broyage mécanique « grande échelle »

La biomasse est récupérée après 48 h de culture sur milieu SS supplémenté en acide benzoïque à 1,25 mM. La biomasse est traitée comme indiqué en II.6.1, p. 74. Elle est ensuite congelée et pilée dans l'azote liquide puis conservée à -80 °C.

L'extraction est réalisée à l'aide d'un disrupteur dit « grande échelle » de marque inconnue (Figure II-3A). Elle est réalisée par une unique bille dans un godet métallique (Figure II-3B).



Figure II-3 Système d'extraction mécanique des protéines intracellulaires de *Sa. algeriensis* : A. Broyeur à bille, B. Godet et bille.

L'aliquot de biomasse congelée (6, 15 ou 30 g) est déposé dans le godet en présence de la bille, après qu'ils aient été préalablement refroidis à l'azote liquide. L'échantillon subit un unique cycle de broyage. Deux temps différents ont été testés : 30 s et 1 min. Ensuite, le broyat cellulaire est suspendu dans du tampon Tris-HCl à raison d'1 mL pour 0,6 g de biomasse. La suspension est centrifugée pendant 30 minutes à 5000 g. Le surnageant constitue l'extrait cellulaire soluble. Les échantillons sont maintenus dans la glace et les centrifugations sont réalisées à 4 °C.

II.8.1.2. Précipitation au sulfate d'ammonium

- Principe

La précipitation au sulfate d'ammonium ou « salting-out » repose sur les propriétés de surface des protéines. Les protéines ne sont pas uniformément chargées. Elles possèdent certaines zones hydrophobes en surface qui régissent l'organisation d'une couche de molécules d'eau. Un sel, tel que le sulfate d'ammonium, piège les molécules d'eau qui sont présentes autour de la protéine et induit une diminution de sa solubilité. En fonction de leur hydrophobicité, les protéines ne précipitent donc pas à la même concentration en sel.

- Fractionnement de l'extrait par précipitation au sulfate d'ammonium

La précipitation fractionnée des protéines de l'extrait est réalisée par ajout de sulfate d'ammonium. L'extrait est successivement porté à 4 pourcentages de saturation différents (20 %, 40 %, 60 % et 80 %) en sulfate d'ammonium. Les cinq fractions protéiques suivantes sont obtenues : 0-20 %, 20-40 %, 40-60 %, 60-80 % et le surnageant final. Une étape de précipitation se déroule de la manière suivante. La quantité de sulfate d'ammonium à ajouter pour atteindre le pourcentage de saturation souhaité est déterminée à l'aide d'un abaque (présenté en Annexe 6). Le sulfate d'ammonium est ajouté progressivement à l'extrait protéique sur une durée suffisante pour permettre la solubilisation du sel. La solution est laissée sous agitation pendant 40 minutes. Les protéines qui ont précipité sont récupérées par centrifugation pendant 20 minutes à 5000 g. Le culot protéique (un volume) est solubilisé dans deux volumes de tampon Tris-HCl 50 mM. Le surnageant quant à lui subit une nouvelle précipitation, c'est-à-dire qu'il est amené à un pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium supérieur. Les étapes décrites ci-dessus sont alors réitérées. Les échantillons sont maintenus dans la glace et les centrifugations sont réalisées à 4 °C.

II.8.1.3. Dialyse

Pour éliminer le sulfate d'ammonium, les culots protéiques, obtenus par précipitation au sulfate d'ammonium et solubilisés dans du tampon, sont dialysés dans 100 fois leur volume de tampon de dialyse Tris-HCl 50 mM, pH 8. Les boudins de dialyse ont un seuil de coupure de 15 kDa. La dialyse est réalisée à 4 °C pendant 12 h. Le bain de dialyse est changé une fois au bout d'une heure. A l'issue de la dialyse, les échantillons sont centrifugés à 5000 g

pendant 20 minutes puis le culot est écarté. Chaque surnageant obtenu constitue une fraction de précipitation au sulfate d'ammonium. Son volume est déterminé et les activités acétyltransférase et benzoyltransférase sont immédiatement quantifiées. Des aliquots sont conservés à -80 °C pour le dosage ultérieur des protéines et le dépôt de la fraction sur gel d'électrophorèse. Le reste du surnageant est congelé rapidement dans l'azote liquide et conservé à -80 °C pour la poursuite de la purification.

II.8.1.4. Chromatographie d'échange d'anion

- Principe

Ce type de chromatographie repose sur les différences de charges des protéines. Les protéines sont amphotères. Leur charge évolue avec le pH du milieu. Le pH pour lequel la charge de la protéine est nulle est le point isoélectrique (pI). Si le pI de la protéine est inférieur au pH du milieu, la protéine est chargée négativement mais s'il est supérieur, la protéine est chargée positivement. Les colonnes d'échange d'anions sont constituées d'une matrice à laquelle sont liées des groupements ionisés positivement (capable de retenir les anions). Les protéines qui sont chargées négativement au pH de la phase mobile sont retenues sur la colonne. L'élution des protéines retenues est ensuite réalisée avec un tampon à force ionique croissante. Les anions du tampon viennent s'échanger avec les protéines retenues. Plus l'interaction ionique entre la protéine et le groupement ionique est faible au pH de la phase mobile plus la protéine est éluée tôt. La force de liaison de la protéine à la colonne est plus ou moins importante en fonction de la proximité de son pI avec le pH du tampon.

- Descriptif de la colonne

La colonne utilisée est une colonne UNOsphere Q (Biorad). Elle possède des groupements ammonium quaternaire ($N^+(CH_3)_3$) qui lui confèrent un caractère d'échangeur d'anions fort. Le volume de la colonne est de 5 mL (dimensions 40 mm L x 12,6 mm DI).

- Conditions chromatographiques

La phase mobile est constituée du tampon A à faible force ionique, Tris-HCl 50 mM pH 8 et du tampon B à forte force ionique, Tris-HCl 50 mM pH 8 + NaCl 1 M. Les tampons sont ajustés à pH 8 à température ambiante (soit aux alentours de pH 8,4 à 4 °C). Ils sont

filtrés sur un filtre membrane en esters de cellulose (seuil 0,2 μm) puis ils sont dégazés pendant 30 minutes avec de l'hélium, juste avant leur utilisation.

La fraction de précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 40-60 %, qui se trouve dans le tampon correspondant aux conditions chromatographiques initiales, soit Tris-HCl 50 mM pH 8, est décongelée dans la glace puis filtrée sur un filtre seringue en acétate de cellulose (seuil 0,45 μm). 3,36 mL de cette fraction sont injectés. Le programme de la chromatographie est précisé dans le Tableau II-8. La séparation est réalisée à un débit de 1,5 mL min⁻¹.

Tableau II-8 Programme « Anion 1 » utilisé pour une première étape chromatographique d'échange d'anions. Le tampon A est le tampon à faible force ionique (Tris HCl 50 mM), et le tampon B est le tampon à forte force ionique (Tris-HCl 50 mM + NaCl 1M). L'échantillon correspond à la fraction de précipitation au sulfate d'ammonium 40-60 %.

	Temps (min)	Tampon A (%)	Tampon B (%)	Echantillon (%)
Equilibrage	0	100	0	0
	6	100	0	0
Injection	6	0	0	100
	8,24	0	0	100
Conditions initiales	8,24	100	0	0
	20	100	0	0
Gradient	20	100	0	0
	54	50	50	0
Lavage	54	0	100	0
	76	0	100	0

Au cours de la purification, les fractions en sortie de colonne sont collectées tous les 3 mL. L'ensemble du système chromatographique, les tampons et les fractions collectées sont maintenus à 4 °C. 800 μL de chaque fraction sont dialysés suivant le protocole indiqué en II.8.1.3, p. 81. Les 2,2 mL restant sont congelés rapidement dans l'azote liquide et conservés à -80 °C pour la poursuite de la purification.

Après la dialyse, le volume des échantillons dialysés est déterminé et les activités benzoyltransférases y sont immédiatement quantifiées. Des aliquots sont conservés à -80 °C pour le dosage ultérieur des protéines et le dépôt des fractions sur gel d'électrophorèse.

II.8.1.5. Chromatographie hydrophobe (HIC)

- Principe

La chromatographie hydrophobe est basée sur l'interaction hydrophobe entre les protéines de l'échantillon (en particulier certains éléments de leur surface) et un ligand hydrophobe fixé sur la matrice de la colonne. Cette interaction est favorisée par l'ajout d'un sel (agent lyotrophique) comme le sulfate d'ammonium dans le tampon d'élution initial. Les protéines retenues sur la colonne sont ensuite éluées, en fonction de l'intensité de leur interaction hydrophobe avec le ligand, lors d'un gradient d'élution avec un tampon à concentration en sel décroissante. Plus l'interaction hydrophobe entre la protéine d'intérêt et le ligand est élevée plus son élution est tardive. La séparation est régit par plusieurs paramètres dont la nature du groupement fonctionnel de la colonne, sa densité de greffage et la concentration initiale en sulfate d'ammonium. Pour favoriser l'élution des protéines si leur interaction avec la colonne est trop forte, certains additifs tels que l'éthylène glycol, le n-propanol, le DMSO ou le DMF peuvent aussi être ajoutés dans le tampon d'élution. Ils sont utilisés dès le début de la chromatographie ou bien une fois le gradient d'élution terminé. Ils peuvent être ajoutés dans le tampon d'élution à une concentration fixe ou croissante.

- Descriptif de la colonne

Une colonne HiTrap Phenyl Fast Flow (high sub) est utilisée. Les ligands de type phényl- sont greffés sur des particules de sépharose de 90 µm de diamètre. La densité de greffage est de 40 µmoles mg⁻¹ de milieu. La colonne possède un volume de 1 mL (dimensions 25 mm L x 7 mm DI).

- Conditions chromatographiques

La phase mobile est constituée d'un tampon A à forte force ionique, phosphate de sodium 50 mM + (NH₄)₂SO₄ 0,7 M (16,5 % de saturation en sulfate d'ammonium) et d'un tampon à faible force ionique, phosphate de sodium 50 mM. Les tampons sont ajustés à pH 7 à température ambiante (pH 7,5 à 4 °C). Ils sont filtrés sur un filtre membrane en esters de cellulose (seuil 0,2 µm). Ils sont enfin dégazés 30 min avec de l'hélium juste avant leur utilisation.

Les fractions possédant une activité benzoyltransférase à la sortie de l'échange d'anion (fraction 16 à 19) sont injectées. Elles sont décongelées dans la glace puis leur tampon est échangé avec le tampon correspondant aux conditions chromatographiques initiales, le

tampon à forte force ionique, phosphate de sodium 50 mM + (NH₄)₂SO₄ 0,7 M. Cette échange est réalisé sur des colonnes de filtration de gel Econopac 10 DG constituées d'une matrice en polyacrylamide Bio-gel P-6DG (seuil de coupure 6 KDa). L'échange de tampon induit une dilution de l'échantillon de départ d'un facteur 1,85 et 16,2 mL d'échantillons sont injectés.

Le programme de la chromatographie est précisé dans le Tableau II-9. La séparation est réalisée à un débit de 1 mL min⁻¹.

Au cours de la purification, les fractions en sortie de colonne sont collectées tous les 2 mL. L'ensemble du système chromatographique, les tampons et les fractions collectées sont maintenus à 4 °C.

A l'issu de la chromatographie, la colonne est lavée successivement à l'eau bidistillée, au NaOH 1N, à l'éthanol à 60 % et 20 % v/v pour éluer les protéines encore retenues à la colonne à l'issu du lavage avec le tampon B. L'absorbance à 280 nm et la conductivité de l'éluat sont monitorées pendant les lavages mais l'éluat n'est pas récupéré car les conditions d'élution sont dénaturantes pour les protéines.

Tableau II-9 Programme « HIC 1 » utilisé pour une seconde étape chromatographique d'interactions hydrophobes. Le tampon A correspond au tampon à forte force ionique (phosphate de sodium 50 mM + (NH₄)₂SO₄ 0,7 M), et le tampon B correspond au tampon à faible force ionique (phosphate de sodium 50 mM). L'échantillon injecté correspond au pool de l'ensemble des fractions actives à l'issu de la chromatographie d'échange d'anions (F16 à F19).

	Temps (min)	Tampon A (%)	Tampon B (%)	Echantillon (%)
Equilibrage	0	100	0	0
	5	100	0	0
Injection	5	0	0	100
	21,26	0	0	100
Conditions initiales	21,26	100	0	0
	40	100	0	0
Gradient	40	100	0	0
	60	50	50	0
Lavage	60	0	100	0
	96	0	100	0

Chaque fraction est entièrement dialysée suivant le protocole indiqué en II.8.1.3, p. 81. Après la dialyse, le volume des échantillons dialysés est déterminé et les activités benzoyltransférase sont immédiatement quantifiées. Des aliquots sont conservés à -80 °C pour le dosage ultérieur des protéines et le dépôt des fractions sur gel d'électrophorèse.

II.8.2. Méthodes analytiques pour le suivi de la purification

II.8.2.1. Dosage d'activité

Les activités enzymatiques sont quantifiées dans les fractions suivant le protocole indiqué en II.7 avec quelques modifications. Elles sont déterminées sur la base de la quantité de dithiolopyrrolones apparue après 10 minutes d'incubation du milieu réactionnel et non sur les mesures à 0, 5 et 10 min. L'activité enzymatique doit être déterminée sur une période où la quantité de produit formé est linéaire dans le temps. La quantité de produit formé évolue linéairement sur 10 min lorsque l'activité enzymatique dans l'échantillon est comprise entre 0,53 U L⁻¹ et 16,7 U L⁻¹ pour l'activité benzoyltransférase et entre 0,53 U L⁻¹ et 20 U L⁻¹ pour l'activité acétyltransférase. Le dosage d'activité est donc réalisé sur l'échantillon préalablement dilué dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 de manière à ce que l'activité volumique dans l'échantillon soient incluse dans la zone de linéarité.

II.8.2.2. Dosage de protéines

Les concentrations en protéines dans les fractions sont déterminées avec la méthode de Bradford (1976) suivant le protocole détaillé en II.7.4.

II.8.2.3. Electrophorèse Native-PAGE

Les différentes fractions protéiques sont aussi analysées par électrophorèse de type Native-PAGE (conditions non dénaturantes) suivant le protocole d'Ornstein et Davis (Ornstein 1964, Davis 1964) dans un système Tetracell 4. Le gel de séparation est réalisé à 10 % d'acrylamide et le gel de concentration à 3 %. La migration est réalisée à 200 V constant pendant 45 min à 4 °C en présence d'un marqueur de taille. Si nécessaire l'échantillon est concentré par ultrafiltration sur un système Vivaspin 2 (Seuil de coupure 10 kDa).

- Colorations des protéines

La détection des protéines sur le gel est réalisée avec du bleu de coomassie R-250 (seuil de détection variant de 36 à 47 ng de protéines par bande) ou du bleu de coomassie colloïdale G-250 (Page Blue Protein Staining Solution) plus sensible que le précédent (seuil de détection de 5 ng de protéines par bande).

- **Mise en évidence de l'activité sur Native-PAGE**

L'activité enzymatique est localisée sur un gel d'électrophorèse réalisé en conditions non dénaturantes. Le gel est réalisé suivant le protocole décrit en II.8.2.3, p. 86. Chaque échantillon est déposé plusieurs fois: deux dépôts pour chaque dosage d'activité dans les bandes et un dépôt témoin qui est colorée au bleu de coomassie R-250. La partie du gel, contenant le dépôt du marqueur de taille et les dépôts témoins, est colorée au bleu de Coomassie R-250. L'autre partie est rincée dans le tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 puis découpée en bandes horizontales aux Rfs souhaités. L'ensemble des opérations est réalisé à 4 °C. Les bandes sont ensuite dosées comme des fractions enzymatiques liquides suivant le protocole indiqué en II.7 p. 74 avec quelques modifications. Le milieu réactionnel (200 µL) contient dans l'ordre d'ajout 20 µL de pyrrothine (solution à 10x dans le méthanol à 556 mg L⁻¹ soit 2,5 mM conservée à -20 °C), 20 µL d'acyl CoA (solution à 10x dans l'eau déionisée soit 5 mM conservée à -20 °C), et 160 µL de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8. La fraction du gel d'électrophorèse à doser y est ajoutée puis le milieu réactionnel est incubé toute la nuit à 30 °C. La réaction enzymatique est stoppée par ajout de 40 µL de TCA à 2,5 % w/v. Après ajout du méthanol (120 µL), le milieu réactionnel est filtré sur un filtre seringue en PVDF (seuil 0,45µm). Le filtrat est introduit dans un vial et les dithiolopyrrolones formées sont dosées par HPLC.

II.8.3. Grandeurs de suivi de la purification

Le facteur de purification (FP) traduit l'enrichissement en protéine d'intérêt. Il est donné par la relation :

$$FP = \text{Activité spécifique de l'étape} / \text{Activité spécifique initiale}$$

Le rendement (R) indique le degré de recouvrement de la protéine d'intérêt. Il est donné par la relation :

$$R = \text{Activité totale de l'étape} / \text{Activité totale initiale}$$

II.9. Etude de l'évolution des activités enzymatiques au cours de leur conservation

II.9.1. Evolution dans la biomasse et dans l'extrait à - 80 °C

La biomasse est récupérée après 24 h de culture sur milieu SS et traitée comme indiqué en II.6.1, p. 74.

Le jour de l'arrêt de la culture, une partie du gâteau cellulaire est disrupté par la méthode Fast prep comme indiqué en II.6.2, p. 74. L'extrait intracellulaire obtenu est aliquoté sous forme d'échantillons de 200 µL. Les échantillons sont congelés dans l'azote liquide et stockés à - 80 °C. Après stockage pendant un temps t, un aliquot est décongelé dans la glace et testé pour ses activités acétyltransférase et benzoyltransférase comme indiqué en II.7, p. 74.

L'autre partie du gâteau cellulaire est broyée dans l'azote liquide, aliquotée en échantillons de 0,6 g de masse humide et stockée à - 80 °C. Après stockage pendant un temps t, un aliquot est décongelé dans la glace et transféré dans un tube Fast prep. L'extrait intracellulaire est obtenu comme indiqué en II.6.2, p. 74 puis testé pour ses activités acétyltransférase et benzoyltransférase comme indiqué en II.7, p. 74.

II.9.2. Evolution dans l'extrait à 4 °C avec ou sans dialyse

La biomasse est récupérée après 48 h de culture sur milieu SS et acide benzoïque à 1,25 mM puis traité et disrupté comme indiqué en II.8.1.1, p. 80 (masse broyée de 30 g, 60 sec de broyage).

1 mL de l'extrait intracellulaire obtenu est stocké 24 h à 4 °C. 1 mL de l'extrait est stocké 12 h à 4 °C puis dialysé pendant 12 h à 4 °C comme décrit en II.8.1.3, p. 81. Ensuite les activités enzymatiques acétyltransférase et benzoyltransférase sont dosées dans les deux extraits comme indiqué en II.7, p. 74.

II.9.3. Influence du cocktail anti-protéases

La biomasse est récupérée après 24 h de culture sur milieu SS puis traitée comme indiqué en II.6.1, p. 74. Elle est broyée dans l'azote liquide et conservée à - 80 °C.

Après décongélation de la biomasse dans la glace, l'extraction des protéines intracellulaires de *Sa. algeriensis* est réalisée par disruption de la biomasse au Fast prep

comme indiqué en II.6.2, p. 74, dans un tampon de lyse Tris-HCl 50 mM pH 8 avec ou sans cocktail anti-protéases. Les activités enzymatiques acétyltransférase et benzoyltransférase sont dosées juste après extraction et après 24 h de conservation des extraits à 4 °C comme indiqué en II.7, p. 74.

II.10. Répétition des expériences et analyse statistique

Les données sur la croissance et la production des dithiolopyrrolones qui sont représentées correspondent à la moyenne obtenue sur trois cultures. Les barres d'erreur indiquent l'erreur type.

Les valeurs indiquées pour les activités spécifiques acyltransférases obtenues à 24 h et 48 h sur les milieux SS, SS supplémenté en acide benzoïque à 1,25 mM et SS supplémenté en acide acétique à 5 mM correspondent à la moyenne sur quatre expériences indépendantes. Les barres d'erreur indiquent l'erreur type.

Les autres activités spécifiques acyltransférases représentées correspondent à une mesure unique. Les barres d'erreur indiquent une erreur type de 15 %, estimée à partir des répétitions effectuées à 24 et 48 h.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec Kaleida Graph 4.0 Software (Synergy Software, Reading, Pennsylvania, USA).

CHAPITRE III

Synthèse de la pyrrothine

Chapitre III. Synthèse de la pyrrothine

Sa. algeriensis produit plusieurs dérivés dithiolopyrrolones potentiellement formés par acylation du noyau pyrrothine. La mise en évidence d'une réaction enzymatique d'acylation de ce noyau chez *Sa. algeriensis* implique la mise au point d'une méthode de détection et de quantification de la réaction pyrrothine N-acyltransférase. Ce test d'activité nécessite de mettre en présence les substrats de la réaction, la pyrrothine et l'acyl-CoA, avec la fraction enzymatique à tester. Or, le noyau pyrrothine n'est pas disponible commercialement bien que certaines dithiolopyrrolones soient disponibles à l'achat¹. Il est donc nécessaire de le synthétiser.

Plusieurs méthodes d'obtention de la pyrrothine sont décrites dans la littérature.

La pyrrothine peut d'abord être obtenue par une hydrolyse acide de la liaison amide des dérivés dithiolopyrrolones. L'obtention de la pyrrothine après une hydrolyse acide ménagée de la thiolutine dans un mélange diphasique HCl/dioxane a ainsi été rapportée (Pfizer and Co 1956, Celmer *et al.* 1952, Celmer *et al.* 1955). Les dithiolopyrrolones hydrolysées peuvent être synthétisées préalablement par voie biologique ou par voie chimique.

Jusqu'en 2007, il n'existait pas de protocole de synthèse chimique directe et totale de la pyrrothine. Les voies de synthèse chimique des dithiolopyrrolones s'avéraient complexes (nombreuses étapes, réactifs de départ non disponibles commercialement) et ne faisaient pas intervenir la synthèse de l'intermédiaire pyrrothine. Ainsi, en 1964, Büchi et Lukas, ont proposé un protocole de synthèse de l'holomycine en 9 étapes à partir d'hydrochlorure de S-benzyl-L-cystéine éthyl ester. Hagio et Yoneda ont proposé une alternative à ce protocole en 1973. La voie de synthèse proposée permet d'obtenir en 7 étapes l'holomycine, la thiolutine et l'auréothricine à partir d'une lactone, le 4-benzoyl-thio-5-benzylthiométhyl-3-hydroxy-2-oxo-2,5-dihydrofurane. En 1977, Ellis *et al.* ont aussi proposé un protocole de synthèse de l'holomycine et de quelques dérivés en 8 étapes à partir de *p*-méthoxyacétophénone. Il faut cependant attendre 2007 pour voir la publication de protocoles de synthèse chimique des dithiolopyrrolones à partir de la dichloroacétone (molécule simple, disponible

¹ Thiolutine disponible chez Sigma Aldrich sous la référence T3450 à 239,5 €/mg

commerciallement et assez peu coûteuse²) avec un nombre d'étapes réduit (6 ou 7 étapes) et faisant intervenir l'holothine ou la pyrrothine comme intermédiaire de synthèse après 5 ou 6 étapes (Hjelmgaard *et al.* 2007, Li *et al.* 2007).

Dans notre travail, deux protocoles de synthèse de la pyrrothine ont été mis en œuvre avec l'intention d'utiliser cette molécule comme substrat de la réaction enzymatique pyrrothine N-acyltransférase. Ils font l'objet de ce troisième chapitre. La pyrrothine a d'abord été obtenue par hydrolyse acide des dithiolopyrrolones produites lors d'une culture de *Sa. algeriensis* (synthèse semi-biologique). Une synthèse de la pyrrothine par voie chimique par adaptation du protocole de Hjelmgaard *et al.* 2007 a également été réalisée.

III.1. Synthèse semi-biologique de la pyrrothine

III.1.1. Obtention des dithiolopyrrolones

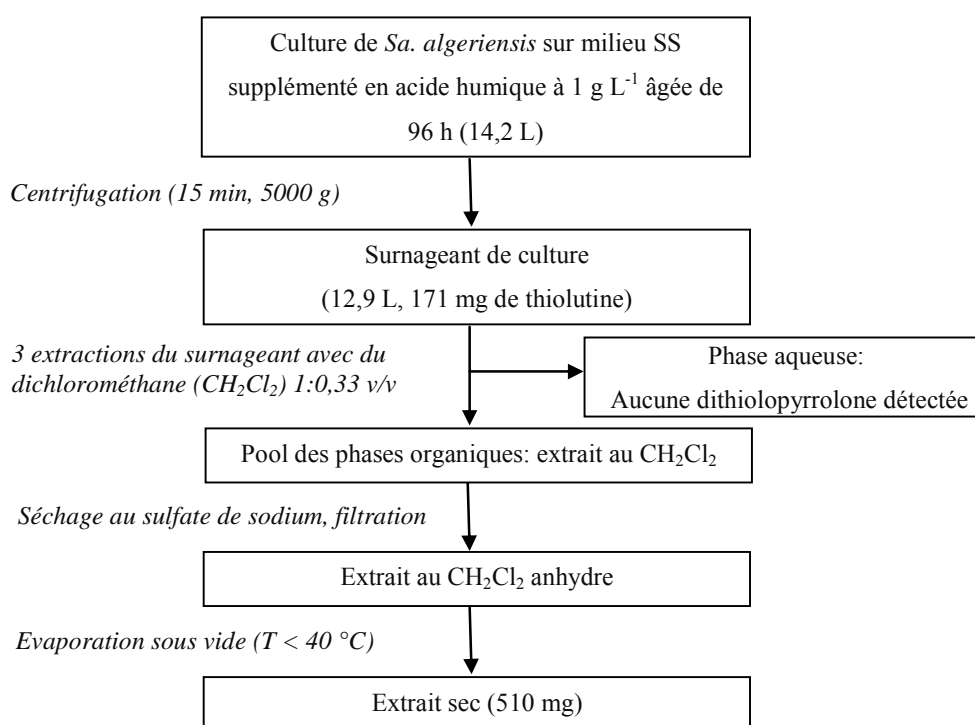


Figure III-1 Schéma de production des dithiolopyrrolones

Après la culture pendant 96 h de *Sa. algeriensis* sur milieu SS supplémenté en acide humique, le surnageant de culture contient 14,2 mg L⁻¹ de thiolutine et aucune autre

² 1 € par g chez Sigma Aldrich en conditionnement de 50 g

dithiopyrrolone n'est quantifiable. Une extraction en trois fois du surnageant de culture avec du dichlorométhane (1:0,33 v/v) aboutit à l'extraction de l'ensemble de la thiolutine du surnageant de culture. En effet, ce dérivé n'est pas détecté dans la phase aqueuse analysée par HPLC (non montré). L'extraction en trois fois permet, tout en utilisant la même quantité de solvant, d'améliorer le rendement d'extraction qui n'est que de 57 % lorsque l'extraction est réalisée en une fois (1:1 v/v) (Figure III-1).

L'extraction au dichlorométhane des dithiopyrrolones s'avère très sélective des composés dithiopyrrolones comme le montre l'analyse HPLC de l'extrait sec (Figure III-2). L'hydrolyse acide est donc réalisée directement sur cet extrait sans purification supplémentaire.

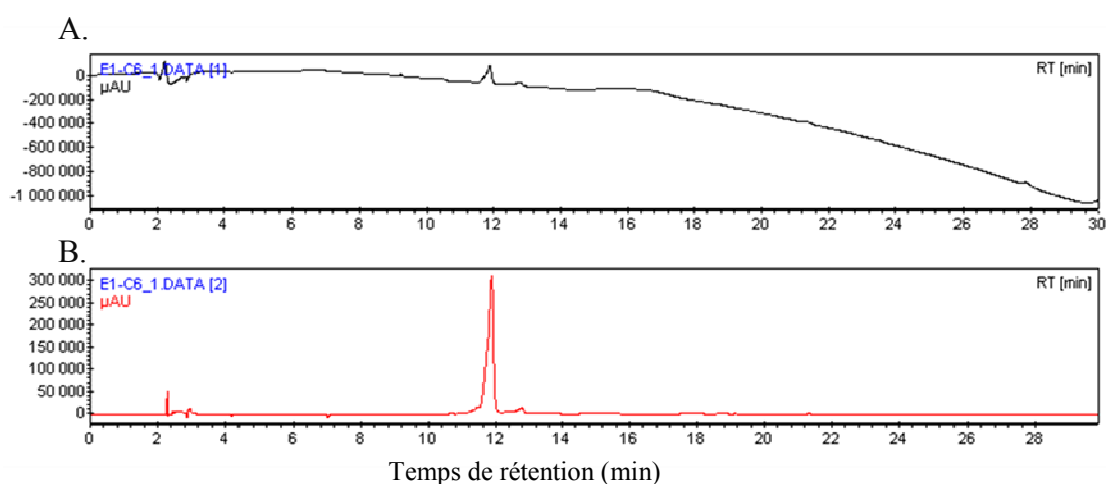


Figure III-2 Analyse de l'extrait sec par la méthode « DTPs extracellulaires » après resuspension dans le méthanol à une concentration de 31,7 mg L⁻¹: A. détection à 220 nm, B. détection à 390 nm. Le pic à Tr = 12 min correspond à la thiolutine.

L'extrait sec a une masse de 510 mg. Les 171 mg de thiolutine présents dans le surnageant initial se retrouvent approximativement dans cet extrait sec puisque l'extraction au CH₂Cl₂ est totale. Ils représentent 33 % de la masse globale.

III.1.2. Hydrolyse acide

L'hydrolyse acide de l'extrait a d'abord été réalisée suivant le protocole breveté par Pfizer and Co (1956) sur une durée de 30 min puis sur une durée plus longue de 60 min sur une partie de l'extrait sec obtenu comme décrit ci-dessus. Dans les conditions de réalisation

de l'hydrolyse, la pyrrothine ne précipite pas dans le milieu réactionnel et ne peut pas être récupérée par filtration comme décrit dans la littérature. L'hydrolysate a donc été évaporé à sec sous pression réduite et analysé par CCM et HPLC pour vérifier la présence de pyrrothine.

Lorsque l'hydrolysate est séparé sur CCM (Figure III-3) dans un mélange chloroforme/méthanol 9:1 v/v, 5 taches se distinguent sous UV (254 nm). Parmi elles, une tache jaune (H1) absente dans l'extrait initial migre avec un R_f de 0,64 légèrement inférieur à celui de la thiolutine ($R_f = 0,68$) et se colore en violet en présence de ninhydrine. Il s'agit vraisemblablement de la pyrrothine qui est légèrement plus polaire que la thiolutine et qui possède une amine primaire libre qui réagit positivement à la ninhydrine (Figure III-3). Les autres tâches (H2, H3, H4, H5) correspondent à des co-produits formés pendant l'hydrolyse. Parmi elles, seule H2 a une couleur jaune. Après coloration à la ninhydrine, seule la partie inférieure de cette tâche réagit positivement. La tache H2 correspond donc à plusieurs co-produits d'hydrolyse jaunes. Une partie de ces co-produits possède une amine libre.

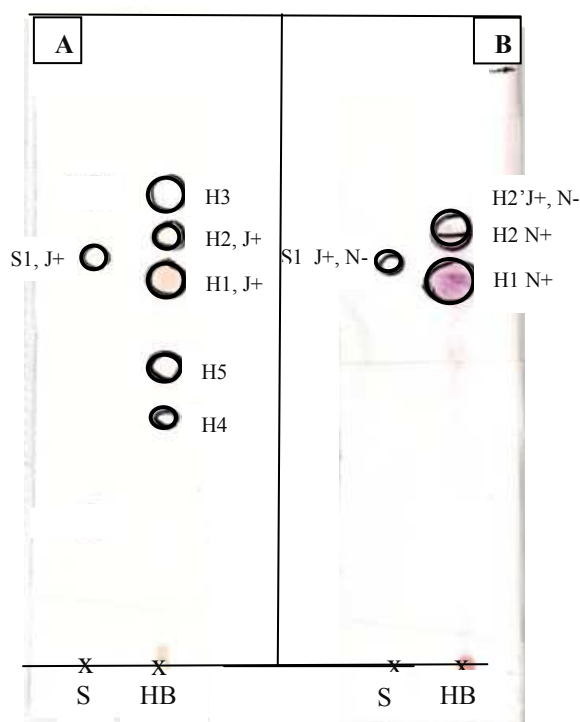


Figure III-3 CCM réalisée avec un mélange chloroforme/méthanol 9:1 v/v. S : standard de thiolutine à 60 mg L^{-1} , dépôt de $40 \text{ }\mu\text{L}$. HB : hydrolysate (60 min) solubilisé dans du méthanol ($3,6 \text{ g L}^{-1}$ d'extrait sec), dépôt de $20 \text{ }\mu\text{L}$. A. Observation sous UV à 254 nm, B. Révélation à la ninhydrine. H1 à H5: taches obtenues après migration de HB. S1 : tâche obtenue après migration de S. J + : la tâche possède une couleur jaune. N + : la tâche se colore en violet en présence de ninhydrine.

L'analyse HPLC de l'hydrolysate avec la méthode « détection pyrrothine » (Figure III-4) montre un pic majoritaire à $T_r = 8,36$ min, non présent dans l'extrait initial et qui est élué juste avant la thiolutine ($T_r = 9,86$ min). Le spectre UV de ce pic, λ_{max} (abs relative) : 225 (0,4), 305 (0,55), 383,6 (1), correspond au spectre UV de la pyrrothine décrit dans la littérature et à celui obtenu pour la pyrrothine synthétisée *à posteriori* par synthèse chimique. Le pic élué à 8,36 min correspond donc probablement à la pyrrothine. L'analyse HPLC de l'hydrolysate indique aussi la présence de plusieurs co-produits dans l'hydrolysate (COP1, $T_r = 24,6$ min, COP2, $T_r = 25,6$ min, COP3, $T_r = 26,9$ min et COP4, $T_r = 27,9$ min) (Figure III-4).

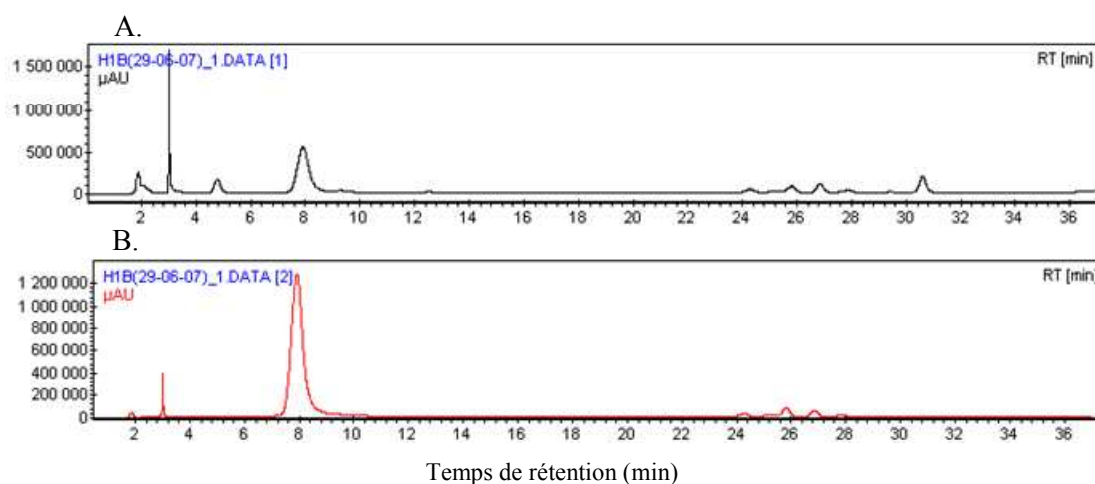


Figure III-4 Chromatogramme de HB (Hydrolyse de 60 min) obtenu après l'analyse suivant la méthode de détection pyrrothine: Vinj = 30 μ L A. Détection à 220 nm, B. Détection à 390 nm.

Le temps d'hydrolyse (30 ou 60 min) influence grandement la composition de l'hydrolysate obtenu (Figure III-5). La quantité de pyrrothine obtenue dans l'hydrolysate est beaucoup plus importante lorsque l'hydrolyse acide dure 60 min. Ainsi le rendement d'hydrolyse après 30 min est de 1,5 % alors qu'il est en moyenne de 49 \pm 8 % après 60 min d'hydrolyse (Tableau III-1). Par ailleurs, l'hydrolysate 60 min contient plus de COP1, COP3 et COP4 que l'hydrolysate 30 min mais moins de COP 2. Enfin, l'hydrolysate contient une petite quantité de thiolutine résiduelle quelque soit le temps d'hydrolyse acide. La quantité de thiolutine résiduelle est de 1,7 et de 5,3 μ g mg^{-1} d'extrait hydrolysé après 30 et 60 min respectivement.

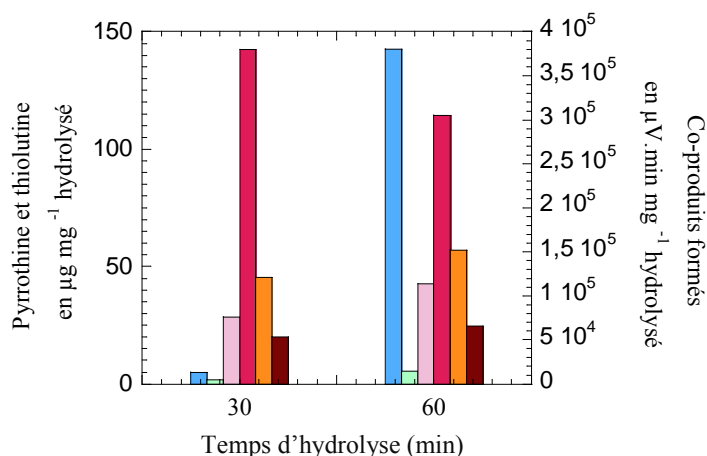


Figure III-5 Influence du temps d'hydrolyse sur la composition de l'hydrolysate : pyrrothine (■), thiolutine (■), co-produit 1 (■), co-produit 2 (■), co-produit 3 (■) et co-produit 4 (■). La pyrrothine et la thiolutine sont exprimées en $\mu\text{g mg}^{-1}$ d'extrait hydrolysé. Les co-produits sont exprimés en aire HPLC ($\mu\text{V.min}$) mg^{-1} d'extrait hydrolysé.

Tableau III-1 Bilan des différentes hydrolyses effectuées

	Extrait (mg)	Thiolutine (mg)	Temps d'hydrolyse (min)	Pyrrothine (mg)	Rendement en % (par rapport à la thiolutine)
Hydrolyse A	183	61	30	0,91	1,5
Hydrolyse B	161	53,8	60	23	43,9
Hydrolyse C	119	39,7	60	21	55,1

Au total, plus de 45 mg de pyrrothine ont pu être obtenus dans les différents hydrolysats (quantification réalisée *a posteriori* à partir d'une gamme étalon réalisée avec la pyrrothine synthétisée par voie chimique) (Tableau III-1).

L'extrait sec obtenu présente une couleur noir et un aspect résineux qui le rend difficilement manipulable. Par ailleurs, il contient un résidu de thiolutine et plusieurs co-produits d'hydrolyse. La pyrrothine doit donc être purifiée à partir de cet extrait.

III.2. Tentatives de purification

Deux méthodes différentes ont été mises en œuvre pour purifier la pyrrothine : la CCE et l'HPLC semi-analytique.

III.2.1. Purification sur CCE

La migration sur CCE est identique à celle observée sur CCM. Les deux taches jaunes H1 (hypothétique pyrrothine) et H2 (co-produits jaunes, ninhydrine +) ont été récupérées sur la CCE par grattage de la silice. Leur analyse par HPLC donne les résultats détaillés ci-dessous. L'analyse de H1 par HPLC (Figure III-6) montre la présence de nombreux pics même à 390 nm: un pic à $Tr = 8,1$ min présentant le spectre UV de la pyrrothine, un pic à 9,7 min correspondant à la thiolutine (même temps de rétention et spectre UV) ainsi qu'un pic élué à 24,4 min correspondant à COP2 (d'après le spectre UV). Dans l'échantillon analysé, la pyrrothine n'est plus aussi majoritaire que dans l'hydrolysats initial. A 390 nm, le pic de pyrrothine ($Tr = 8,08$ min) représente seulement 38 % du total des aires alors qu'il représente 88 % des aires dans l'hydrolysats. Enfin, le taux de récupération de la pyrrothine dans H1 n'est que de 7 %.

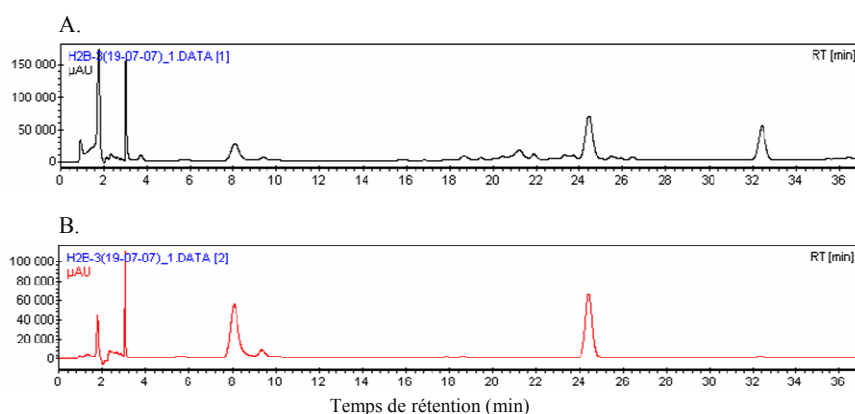


Figure III-6 Chromatogramme de la bande H1 analysée avec la méthode « détection pyrrothine ».
A. Détection à 220 nm. B. Détection à 390 nm. L'aire est exprimée en $\mu V \cdot \text{min}$ et le temps de rétention en min.

L'analyse HPLC de la bande H2 (Figure III-7) obtenue sur CCE indique la présence dans la bande d'une quantité très minoritaire de pyrrothine (3,4 % du total des aires à 390 nm) éluée à 8 min et la présence de plusieurs pics élués à $Tr = 23$ min, $Tr = 24,6$ min (COP1), $Tr = 25,6$ min (COP2) et $Tr = 26,7$ min (COP3). Le pourcentage de récupération de la pyrrothine dans H2 n'est que de 0,26 %.

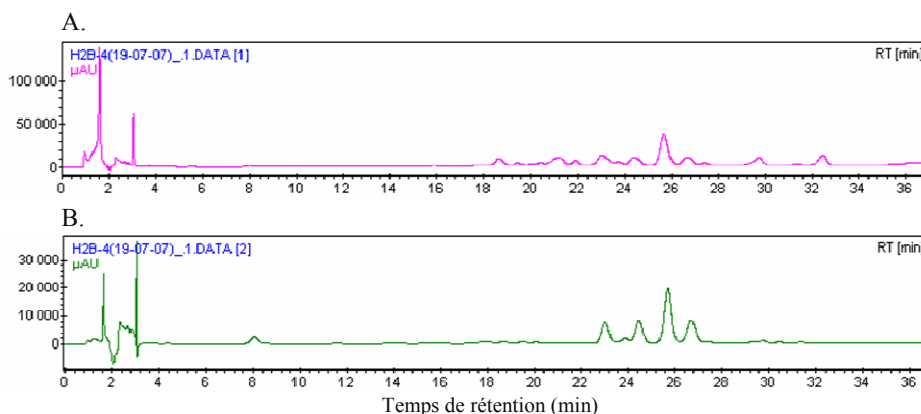


Figure III-7 Chromatogramme de la bande H2 analysée avec la méthode « détection pyrrothine ».
A. Détection à 220 nm. B. Détection à 390 nm. L'aire est exprimée en $\mu\text{V}\cdot\text{min}$ et le temps de rétention en min.

Au vu de ces résultats, une deuxième méthode plus résolutive est utilisée pour tenter de purifier la pyrrothine : l'HPLC semi-analytique en phase inverse.

III.2.2. Purification sur HPLC semi-analytique

La pyrrothine présente dans l'hydrolysate HB est purifiée sur HPLC semi-analytique suivant la méthode « purification pyrrothine ». La collection des fractions en sortie de colonne et leur analyse par HPLC analytique suivant la méthode « détection pyrrothine » donne les résultats présentés en Figure III-8.

La fraction 2 (Figure III-8A), éluée de 7 à 12 min, montre un pic correspondant à la pyrrothine ($T_r = 7,8$ min), un pic correspondant à la thiolutine ($T_r = 9,1$ min) et un pic correspondant à COP2 ($T_r = 25$ min). La fraction 9-10 (Figure III-8B) éluée de 32 à 37,5 min, à 32 % de CH_3CN contient le premier co-produit d'hydrolyse COP1. L'analyse sur HPLC analytique de la fraction C7-11 (Figure III-8C) éluée à 40 min avec 34 % de CH_3CN montre que celle-ci contient à la fois de la pyrrothine et COP2 comme l'indique la présence de deux pics à $T_r = 8$ min et $T_r = 25,1$ min respectivement.

Ainsi, la pyrrothine est présente avec COP2 dans deux fractions d'élution bien distinctes, la fraction 2 éluée de 7 à 12 min et la fraction 11 éluée à 40 min. Elle n'est pourtant pas présente entre ces deux fractions d'élution, dans la fraction 9-10.

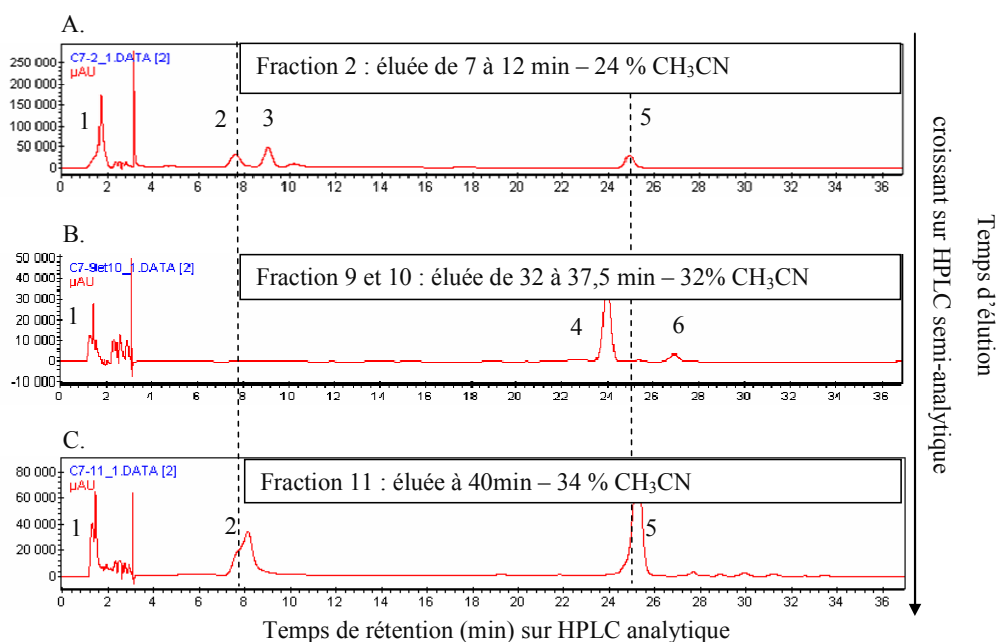


Figure III-8 Purification de l'hydrolysate HB sur chromatographie semi-analytique en phase inverse suivant la méthode « purification pyrrothine » : Analyse des fractions d'élution par chromatographie analytique suivant la méthode « détection pyrrothine ». A. Analyse de la fraction 2. B. Analyse de la fraction 9 et 10 rassemblées C. Analyse de la fraction 11. La détection est réalisée à 390 nm en chromatographie analytique. 1. produits polaires non retenus, 2. pyrrothine, 3. thiolutine, 4. COP1, 5. COP2. L'aire est exprimée en $\mu\text{V}\cdot\text{min}$ et le temps de rétention en min.

Les résultats des différentes tentatives de purification qui ont été entreprises semblent montrer qu'il est impossible d'isoler la pyrrothine de COP2. Par ailleurs dans tous les cas le taux de récupération de la pyrrothine est très faible ($< 10\%$).

III.2.3. Stabilité de la pyrrothine

Les difficultés rencontrées lors des tentatives de purification de la pyrrothine peuvent être dues à une instabilité de la pyrrothine en conditions de purification. Par conséquent, des tests de stabilité de la pyrrothine ont été réalisés sur l'hydrolysate, sur la bande H1 récupérée sur CCE et sur la fraction d'élution 11 obtenue lors de la purification de la pyrrothine sur HPLC semi-analytique. Les résultats sont présentés en Figure III-9.

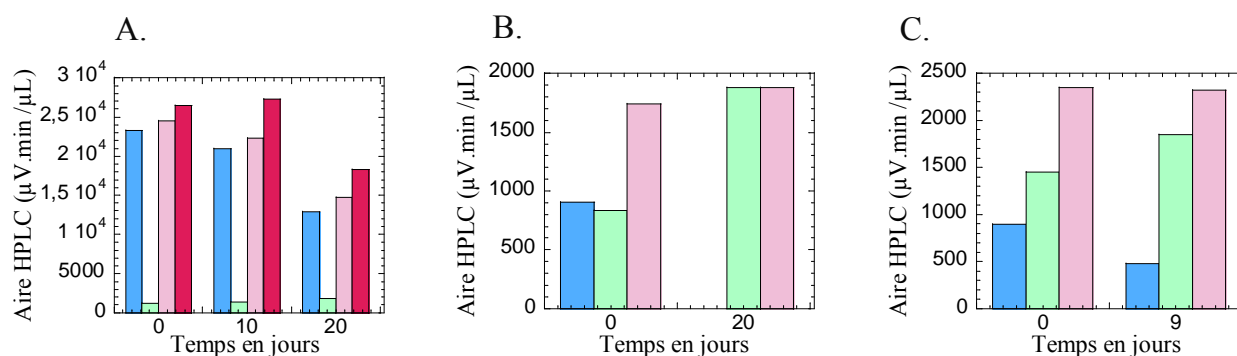


Figure III-9 Stabilité de la pyrrothine au cours du temps de conservation à -24 °C dans le méthanol. Résultats des analyses HPLC réalisées suivant la méthode « détection pyrrothine ». Aire HPLC à 390 nm de la pyrrothine (■), de COP 2 (■), Somme des aires à 390 nm de la pyrrothine et de COP2 (■), Somme des aires à 390 nm (■). Tests réalisés sur : A. Hydrolysats 60 min HB, B. H1 obtenue sur CCE, C. F11 obtenue sur HPLC semi-analytique. Les aires sont exprimées en $\mu V \cdot min / \mu L$ injecté et le temps en jours.

Dans les fractions de pyrrothine purifiée (H1 et F11) (Figure III-9 B. et C.), conservées à -24 °C dans le méthanol, une diminution de la quantité de pyrrothine au cours du temps est observée. Cette diminution de la quantité de pyrrothine est concomitante à une augmentation de la quantité de COP2 alors que la somme des aires des pics correspondants à ces deux produits reste stable. Ces observations semblent montrer une transformation de la pyrrothine en COP2 au cours du temps et pourraient expliquer les difficultés à isoler la pyrrothine de COP2.

Dans l'hydrolysats HB (Figure III-9A.), à 3,6 g L⁻¹ d'extrait sec soit 561 mg L⁻¹ de pyrrothine conservé à -24 °C dans le méthanol, la quantité de pyrrothine diminue aussi avec le temps. Cependant, dans ce cas, cette diminution n'est pas associée avec une augmentation de la quantité de COP2. De plus, la somme des aires à 390 nm diminue elle aussi. Dans ce cas la diminution de la quantité de pyrrothine ne peut être attribuée à une transformation en COP2.

La pyrrothine peut donc être obtenue par hydrolyse acide ménagée de dérivés dithiopyrrolones produites microbiologiquement par *Sa. algeriensis*. Cependant, les deux méthodes de purification de la pyrrothine employées ne permettent pas de récupérer la pyrrothine présente dans l'hydrolysats dans des quantités suffisantes et d'améliorer significativement sa pureté. D'autre part, la pyrrothine ne semble pas être stable dans le milieu réactionnel d'hydrolyse dans lequel elle est stockée. Par conséquent, la synthèse

chimique totale de la pyrrothine est entreprise pour tenter d'obtenir une grande quantité de pyrrothine présentant un meilleur degré de pureté que l'hydrolysats obtenu jusque là.

III.3. Synthèse chimique de la pyrrothine

La synthèse de l'hydrochlorure de la 6-amino-4-méthyl-[1,2]-dithiolo-[4,3-*b*]-pyrrol-5-one, ou pyrrothine, a été réalisée, par adaptation du protocole décrit par Hjelmgaard *et al.* (2007) pour la synthèse de l'holothine et de ses dérivés dithiolopyrrolones, suivant le schéma présenté sur la Figure II-2. Le groupement méthyle porté par l'azote cyclique est introduit lors de l'étape (b) en remplaçant la *p*-méthoxybenzylamine par de la méthylamine (Li *et al.*, 2007). Finalement, le groupement amide de la trifluoroacétyl-pyrrothine **5** est hydrolysé à reflux dans le méthanol en présence d'HCl aqueux concentré (f) pour permettre l'obtention de la pyrrothine **6** qui est récupérée par filtration sous forme d'une poudre de couleur orangé-brun. Le rendement global est de 3,53%. Le spectre RMN ^1H du produit obtenu est cohérent avec la structure de la pyrrothine. δ_{H} (DMSO- d_6): 7,41 (1H, s, C=CH), 3,9-5,3 (1H, s large, NH_3^+), 3,27 (3H, s, CH_3) (Annexe 4). Par ailleurs l'analyse HPLC de la pyrrothine indique que le pic majoritaire possède le spectre UV suivant : λ_{max} (absorbance relative) 225 (0,39), 305 (0,55), 385 (1) qui correspond à celui décrit dans la littérature pour la pyrrothine (Pfizer and Co 1956, Celmer *et al.* 1952). La pyrrothine ainsi obtenue (90 mg) possède donc les critères requis (quantité supérieure à 10 mg, pureté et structure validée par RMN) pour son usage pour un test d'activité enzymatique.

III.4. Discussion

La pyrrothine a d'abord été obtenue par hydrolyse acide des dithiolopyrrolones obtenues lors d'une culture de *Sa. algeriensis* (voie semi-biologique).

La production des dithiolopyrrolones a alors été menée sur milieu SS supplémenté en acide humique à 1 g L^{-1} car il a été montré précédemment que la présence d'acide humique dans le milieu de culture stimule la production de l'ensemble des dithiolopyrrolones (Bouras *et al.* 2006b). Cependant la concentration en thiolutine obtenue, 12 mg L^{-1} , et l'absence de détection des autres dithiolopyrrolones, indique une production des dérivés dithiolopyrrolones beaucoup plus faible que celle rapportée par Bouras *et al.* (2006b). Ces auteurs avaient en effet observés des productions volumiques de 210 ; 0,1 ; 4,13 ; 18 ; et $13,2 \text{ mg L}^{-1}$ pour la

thiolutine, ISP, BUP, TIP et SEP respectivement sur milieu SS supplémenté en acide humique à 1 g L⁻¹ à 72 h.

La faible production en dithiopyrrolones pourrait être le résultat de l'évolution génétique de la souche de *Sa. algeriensis* utilisée. Elle aurait pu perdre en partie sa capacité à produire les dithiopyrrolones suite à plusieurs repiquages. L'instabilité génétique des actinomycètes a été largement rapportée dans la littérature notamment pour des souches du genre *Streptomyces*. Elle se manifeste par un très fort taux de mutations affectant certains traits spécifiques des espèces. Les phénotypes instables peuvent ainsi être perdus à des fréquences pouvant atteindre 0,1 %. (Dyson and Schrenpf 1987, Birch *et al.* 1990). Ainsi, par la suite, une nouvelle banque de travail de la souche (stock de spores) a été réalisée à partir de *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 obtenue de l'Institut Pasteur d'Alger. La production des dithiopyrrolones sur milieu SS est plus importante lorsque la souche provient de ce nouveau stock. Une production biologique des dithiopyrrolones avec la souche stockée dans cette nouvelle banque de travail permettrait donc vraisemblablement d'obtenir une meilleure production volumique en dithiopyrrolones sur milieu SS et acide humique.

Lors de l'hydrolyse acide ménagée des dithiopyrrolones, la précipitation de la pyrrothine décrite dans la littérature n'a pas eu lieu. La précipitation a lieu si des proportions adaptées en thiolutine, acide chlorhydrique et dioxane sont utilisées (Pfizer and Co 1955). Il est possible que les quantités introduites dans le milieu réactionnel lors de notre étude, calculées sur la base de la quantité d'extrait sec totale, ne permettent pas cette précipitation. Plusieurs éléments ont pu fausser le calcul des proportions d'HCl et de dioxane à utiliser :

- L'extrait sec ne contient pas que des dithiopyrrolones
- L'extrait pesé n'est pas assez sec

Un élément vient appuyer cette hypothèse: la quantité de thiolutine quantifiée par HPLC dans le milieu de production (170 mg) est bien inférieure à la quantité d'extrait total obtenue (510 mg). Pour un meilleur contrôle des quantités d'HCl, de dioxane et de dithiopyrrolones ajoutées dans le milieu réactionnel, l'extrait obtenu devrait être séché dans un dessicateur sous pression réduite en présence d'un dessicant tel que l'anhydride de phosphate P₂O₅. Si la masse sèche de l'extrait s'avère trop différente de la quantité de dithiopyrrolones dans l'extrait alors ces dérivés devraient être purifiés avant de réaliser l'hydrolyse si l'on souhaite récupérer la pyrrothine par précipitation. Cette purification pourrait être réalisée par recristallisation de l'extrait dans l'acétate d'éthyle (Annexe 2).

Par ailleurs, le temps d'hydrolyse préconisé dans la littérature (30 min) n'a pas permis d'obtenir le rendement attendu en pyrrothine (60 %). Ce résultat pourrait être attribué au système de chauffage à reflux utilisé qui ne permet ni le contrôle de la température dans le milieu réactionnel, ni l'agitation du mélange. Cependant l'augmentation du temps d'hydrolyse à 60 min a permis d'obtenir un rendement moyen de 49 % qui tend vers le rendement de référence de 60 %.

Enfin, aucune méthode n'a pu être trouvée pour la purification de la pyrrothine présente dans l'hydrolysate. La pyrrothine n'a pas pu être isolée du composé appelé COP2, présent à la fois dans le milieu d'hydrolyse et dans les fractions de pyrrothine purifiée. Par ailleurs le rendement des différentes méthodes utilisées s'est avéré inférieur à 10 %. Cette difficulté à purifier la pyrrothine avec un rendement satisfaisant pourrait être due à sa transformation en COP2 comme le montre les tests de stabilité effectués sur les fractions purifiées de la pyrrothine. L'instabilité de la pyrrothine sous sa forme neutre est d'ailleurs mentionnée par Li *et al.* (2007) bien que ces auteurs ne décrivent aucun mécanisme ou produit de transformation. Une purification de la pyrrothine par recristallisation dans du chloroforme pourrait toutefois être testée. En effet dans ce solvant, les dithiopyrrolones et les co-produits d'hydrolyse sont solubles au contraire de la pyrrothine (non montré).

En conclusion la synthèse de la pyrrothine par voie semi-biologique, telle qu'elle a été réalisée dans notre étude n'a pas permis *in fine* d'obtenir une quantité de pyrrothine présentant les critères de pureté requis pour son usage dans un test biologique. Bien que le protocole d'hydrolyse des dithiopyrrolones soit breveté, il s'est avéré difficile à mettre en œuvre à l'échelle du laboratoire, sur de petites quantités de dithiopyrrolones obtenues par voie biologique et peu purifiées. En outre, l'étape de production biologique a été rendue plus laborieuse par l'usage d'une souche qui ne produisait pas les dithiopyrrolones de manière optimale. Un certain nombre de méthodes et de propositions d'amélioration des protocoles sont toutefois rapportées dans ce chapitre pour pouvoir réaliser ultérieurement la production semi-biologique de la pyrrothine au laboratoire.

Un autre protocole de synthèse de la pyrrothine a donc été mis en œuvre avec l'intention d'utiliser cette molécule comme substrat de la réaction enzymatique pyrrothine N-acyltransférase. Une synthèse chimique totale de la pyrrothine a été réalisée par adaptation du protocole de Hjelmgaard *et al.* (2007). Le rendement global de la synthèse de la pyrrothine, 3,5 %, s'avère plus faible que celui obtenu pour la synthèse de l'holothine par Hjelmgaard *et*

al. (2007), 17,8 %. Pour améliorer le rendement global, le rendement de l'étape (d) (54 % au lieu de 86 %) pourrait être potentiellement amélioré en réalisant la réaction avec du butanoate d'ammonium à 100 °C (Li *et al.* 2007) car son utilisation limite la formation de co-produits.

Il faut cependant noter que, lors de la synthèse réalisée, les étapes de purification des produits (2) et (3) ont été considérablement simplifiées par rapport à celles rapportées par Hjelmgaard *et al.* (2007) pour la synthèse de l'holothine. Par ailleurs, la pyrrothine est directement utilisable pour des tests biologiques sans purification supplémentaire alors que dans la publication de référence son pendant, l'holothine, n'est pas purifié car ce n'est qu'un intermédiaire de synthèse. Ce protocole fournit donc une méthode rapide de synthèse de la pyrrothine pour l'utilisation de ce produit dans des tests biologiques.

CHAPITRE IV

Expression des activités pyrrothine N-acyltransférases
chez *Sa. algeriensis* NRRL B-24137

Chapitre IV. Expression des activités pyrrothine N-acyltransférases chez *Sa. algeriensis* NRRL B-24137

L'activité biologique des dithiolopyrrolones est particulièrement influencée par la nature des radicaux variables et notamment celle du groupement acyl (R₂) lié par une liaison amide à l'azote exocyclique (N₇) (Oliva *et al.* 2001, Chen *et al.* 2003, Li *et al.* 2007, Guo *et al.* 2008). Par conséquent il est important de comprendre ce qui détermine *in vivo* la nature des dithiolopyrrolones formées (nature du radical R₂), pour pouvoir par la suite influencer le type de dérivé produit.

Malheureusement, il y a peu de connaissances sur la voie de biosynthèse des dithiolopyrrolones. Seule une hypothétique voie de biosynthèse a été proposée par Furumai *et al.* (1982). Ainsi, la L-cystine a été identifiée comme précurseur potentiel du noyau pyrrothine. La formation d'une liaison amide entre la pyrrothine et un acide organique activé sous forme d'un acyl-CoA permettrait finalement la synthèse des dithiolopyrrolones. La présence d'une activité enzymatique qui catalyse la formation d'une liaison amide entre le noyau holothine (desacétyl-holomycine) et un acétyl-CoA a par ailleurs été confirmée dans extraits cellulaires de mutants de *Streptomyces clavuligerus* producteurs d'holomycine (De La Fuente *et al.* 2002). Cependant, l'enzyme responsable de cette activité n'a pas encore été purifiée.

L'influence de la composition du milieu de culture sur la production des dithiolopyrrolones a aussi apporté des informations sur leur voie de biosynthèse chez *Sa. algeriensis*. En effet, l'addition de précurseurs potentiels au milieu de culture (acides organiques, acides aminés) mène à d'importantes modifications des niveaux de productions des dithiolopyrrolones et à la synthèse dirigée par les précurseurs de nouveaux dérivés. Cependant rien n'est connu sur les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de ces molécules par cette souche.

La réaction enzymatique d'acylation du noyau pyrrothine a donc été étudiée chez *Sa. algeriensis*. L'objectif est d'approfondir les connaissances sur la voie de biosynthèse des dithiolopyrrolones. Il s'agit en particulier de mieux comprendre la capacité de la souche à produire de nombreuses dithiolopyrrolones et à adapter sa production au milieu de culture.

L'existence d'enzyme(s) catalysant le transfert d'un groupement acyl d'un acyl-CoA vers la pyrrothine (réaction pyrrothine N-acyltransférase) a été vérifiée pour deux substrats

modèles, l'acétyl-CoA et le benzoyl-CoA, dans un extrait cellulaire de *Sa. algeriensis*. Pour comprendre l'effet exercé par les acides organiques sur la production des dithiopyrrolones, l'expression de ces activités enzymatiques a été étudiée sur différents milieux de cultures supplémentés en acides organiques. Ces études d'expression ont ensuite été mises en relation avec les cinétiques de production des dithiopyrrolones obtenues dans les mêmes conditions.

IV.1. Implication d'activités enzymatiques pyrrothine N-acyltransférases dans la production de thiolutine et de benzoyl-pyrrothine (BEP).

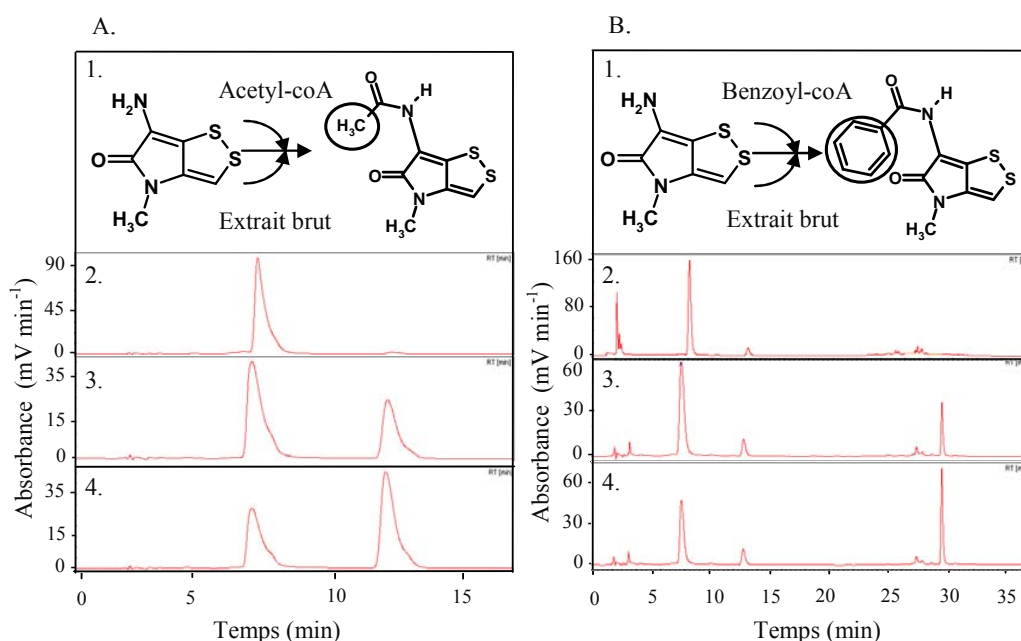


Figure IV-1 Conversion de la pyrrothine en dithiopyrrolones : A. Conversion de la pyrrothine (Tr = 7 min) en thiolutine (Tr = 12,3 min) et B. Conversion de la pyrrothine (Tr = 8 min) en benzoyl-pyrrothine (Tr = 29 min). (1.) Schéma réactionnel. (2. à 4.) Analyse HPLC de la pyrrothine et des dithiopyrrolones présentes dans la réaction à 0 (2.), 5 (3.) et 10 minutes (4.). L'absorbance est donnée en mV min⁻¹ et le temps en minutes.

L'activité enzymatique pyrrothine N-acyltransférase a été dosée dans un extrait cellulaire obtenu suite à une culture de *Sa. algeriensis* sur milieu SS. Une apparition de thiolutine ou de BEP, linéaire dans le temps sur 10 minutes, est observée lorsque l'acétyl-CoA et le benzoyl-CoA sont utilisés respectivement comme substrats donneurs du groupement acyl (Figure IV-1).

Aucune production de thiolutine ou de BEP n'est par contre observée en l'absence d'un des éléments du milieu réactionnel : l'acyl-CoA, l'extrait cellulaire ou la pyrrothine. Ces

résultats mènent à la conclusion que les activités enzymatiques pyrrothine N-acétyltransférase et pyrrothine N-benzoyltransférase sont présentes dans l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis*.

IV.2. Productions de biomasse, de thiolutine et de BEP sur milieu SS

La biomasse et les dithiolopyrrolones (thiolutine, BEP) ont été quantifiées au cours d'une culture sur milieu SS (Figure IV-2.). L'évolution du taux de croissance, de la production spécifique de la thiolutine et de la BEP sont montrées sur la Figure IV-3.

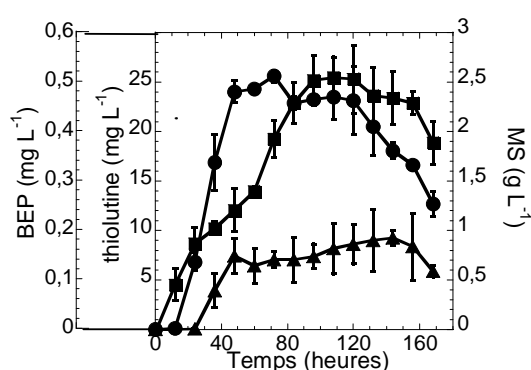


Figure IV-2 Evolution de la croissance (MS, ■), de la production de la thiolutine (●) et de la benzoyl-pyrrothine (BEP, ▲) au cours de cultures de *Sa. algeriensis* sur milieu SS. La masse sèche (MS) est exprimée en g L^{-1} , la production d'antibiotiques en mg L^{-1} et le temps en heures.

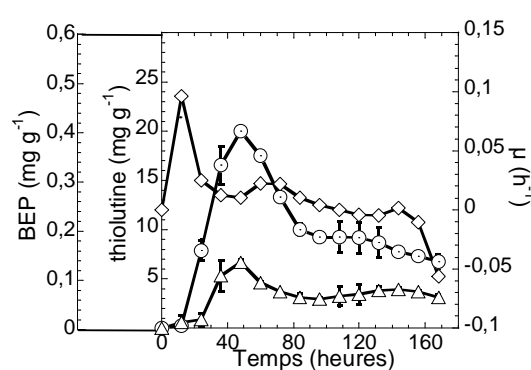


Figure IV-3 Evolution du taux de croissance (μ , ◇), et de la production spécifique en thiolutine (○) et benzoyl-pyrrothine (BEP, Δ) au cours de cultures de *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 sur milieu SS. Le taux de croissance est indiqué en h^{-1} , les productions spécifiques en mg g^{-1} de MS et le temps en heures.

Deux périodes de croissance distinctes sont observées. Chaque période de croissance se caractérise par une augmentation du taux de croissance suivie d'une diminution. Entre 0 et 48 h, le taux de croissance atteint la valeur maximale de $0,096 \text{ h}^{-1}$ à 12 h puis diminue jusqu'à la valeur de $0,010 \text{ h}^{-1}$ à 48 h. A la fin de cette première période de croissance, une MS de $1,2 \text{ g L}^{-1}$ est observée. Entre 60 et 96 h, le taux de croissance spécifique augmente de nouveau jusqu'à $0,022 \text{ h}^{-1}$ à 60 h puis décroît jusqu'à zéro à 96 h. Le taux de croissance spécifique maximal durant cette seconde période est 4,4 fois plus faible que durant la première. La MS maximale de $2,5 \text{ g L}^{-1}$ est atteinte à 96 h. Ensuite, la quantité de biomasse mesurée chute probablement à cause d'un phénomène de lyse cellulaire.

Les productions de thiolutine et de BEP démarrent respectivement à 24 h et 36 h de culture. Le niveau de thiolutine maximal, 25,6 mg L⁻¹ est mesuré à 72 h. Ensuite, la concentration en thiolutine dans le milieu de culture chute. Une production de BEP de 0,15 mg L⁻¹ a été mesurée dès 48 h, soit 80 % de la concentration maximale en BEP, 0,18 mg L⁻¹ observée après 144 h seulement. Les productions spécifiques maximales de thiolutine et de BEP sont atteintes à 48 h à la fin de la première période de croissance lorsque le taux de croissance est à son niveau le plus bas, 0,010 h⁻¹. Des productions spécifiques maximales de 20 mg g⁻¹ et 0,12 mg g⁻¹ sont observées pour la thiolutine et BEP respectivement. La vitesse de production spécifique maximale en thiolutine, 0,70 mg g⁻¹ h⁻¹ est atteinte à 24 h et celle de la BEP, 0,006 mg g⁻¹ h⁻¹ est observée à 36 h alors que le taux de croissance est réduit respectivement à 26,5 % et 12 % de son niveau maximal.

IV.3. Ajout d'acide benzoïque et d'acide acétique au milieu de culture

La croissance, la production de la thiolutine et de la BEP sur milieu SS supplémenté en acide benzoïque à 1,25 mM sont montrées Figure IV-4. L'évolution du taux de croissance, de la production spécifique de la thiolutine et de la BEP sont par ailleurs représentées Figure IV-5.

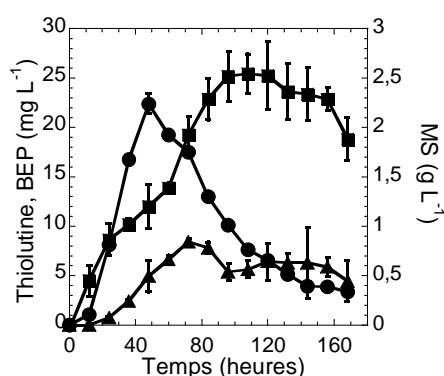


Figure IV-4 Evolution de la croissance (MS, ■), de la production de la thiolutine (●) et de la benzoyl-pyrrothine (BEP, ▲) au cours de cultures de *Sa. algeriensis* sur milieu SS supplémenté en acide benzoïque à 1,25 mM. La masse sèche (MS) est exprimée en g L⁻¹, la production d'antibiotiques en mg L⁻¹ et le temps en heures.

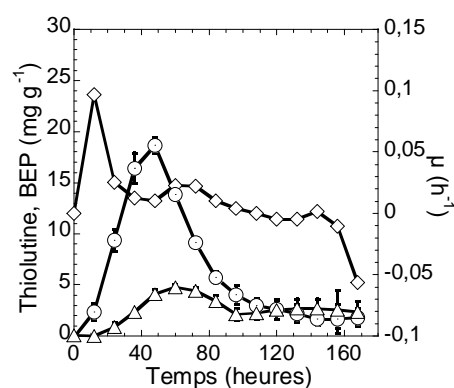


Figure IV-5 Evolution du taux de croissance (μ , ◇), et de la production spécifique en thiolutine (○) et benzoyl-pyrrothine (BEP, Δ) au cours de cultures de *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 sur milieu SS supplémenté en acide benzoïque à 1,25 mM. Le taux de croissance est indiqué en h⁻¹, les productions spécifiques en mg g⁻¹ de MS et le temps en heures.

Une production maximale de BEP de $8,47 \text{ mg L}^{-1}$ est observée à 72 h. La production de BEP est donc 56 fois plus élevée que sur milieu SS. Par ailleurs, une production spécifique maximale de BEP de $4,77 \text{ mg g}^{-1}$ est observée à 60 h. Cette valeur est 39 fois plus élevée que celle atteinte sur milieu SS. De plus, la vitesse de production spécifique maximal de BEP, $0,15 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ à 36 h, est 25 fois plus élevée que sur milieu SS. *A contrario*, la production de thiolutine et de biomasse n'est pas significativement affectée par l'addition d'acide benzoïque dans le milieu de culture.

La biomasse et les dithiolopyrrolones ont aussi été quantifiées au cours d'une culture de *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 sur milieu SS avec de l'acide acétique à 5 mM (Figure IV-6). L'évolution du taux de croissance, des productions spécifiques de thiolutine et de BEP sont montrées Figure IV-7.

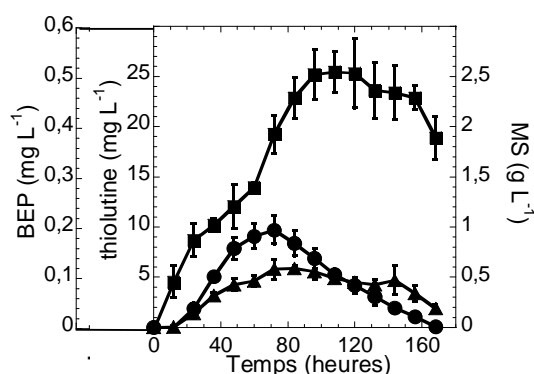


Figure IV-6 Evolution de la croissance (MS, ■), de la production de la thiolutine (●) et de la benzoyl-pyrrothine (BEP, ▲) au cours de cultures de *Sa. algeriensis* sur milieu SS supplémenté en acide acétique à 5 mM. Le temps est exprimé en heures, la masse sèche (MS) en g L^{-1} et la production d'antibiotiques en mg L^{-1} .

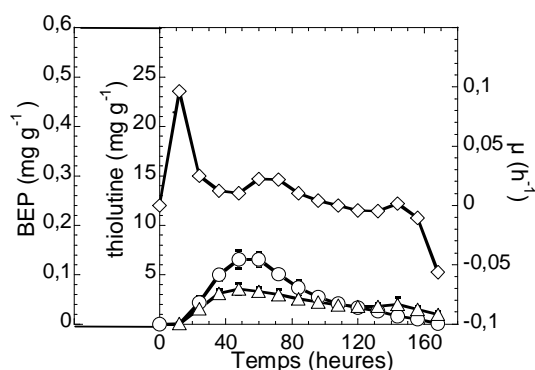


Figure IV-7 Evolution du taux de croissance (μ , ◇), et de la production spécifique en thiolutine (○) et benzoyl-pyrrothine (BEP, Δ) au cours de cultures de *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 sur milieu SS supplémenté en acide acétique à 5 mM. Le taux de croissance est indiqué en h^{-1} , les productions spécifiques en mg g^{-1} de MS et le temps en heures.

Une concentration maximale en thiolutine de $9,68 \text{ mg L}^{-1}$, 2,6 fois plus faible que sur milieu SS, est observée à 72 h. Les données recueillies montrent aussi que la production spécifique de thiolutine atteint une valeur maximale de $6,53 \text{ mg g}^{-1}$ à 48 h, trois fois plus faible que celle sur milieu SS. Enfin, la vitesse de production spécifique de la thiolutine est aussi réduite par l'ajout d'acide acétique. La valeur de $0,23 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, trois fois plus faible

que celle sur milieu SS, est atteinte à 24 h. Par contre, l'ajout d'acide acétique ne modifie pas significativement la croissance et la production de BEP.

IV.4. Expression des activités pyrrothine N-acyltransférases sur milieu SS

L'évolution des activités spécifiques acétyltransférase et benzoyltransférase durant la culture de *Sa. algeriensis* sur milieu SS sont montrées Figure IV-8A.

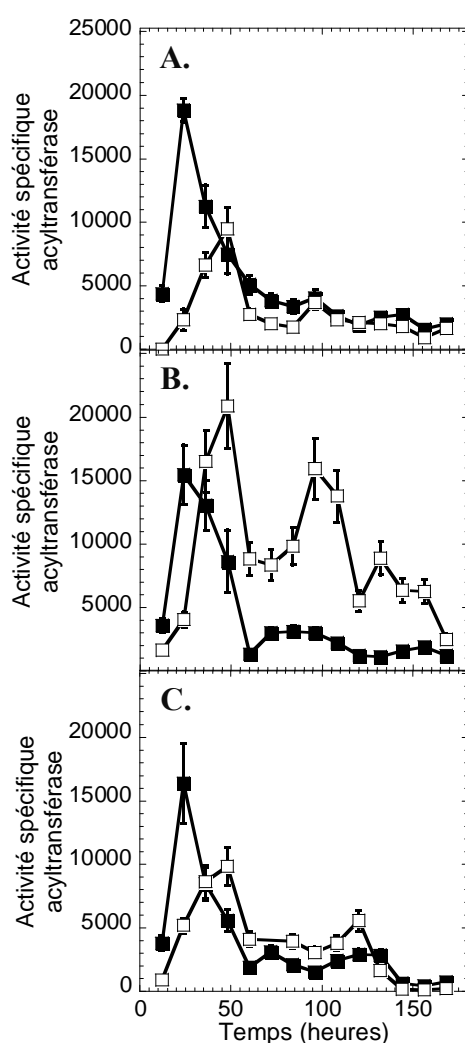


Figure IV-8 Evolution des activités spécifiques pyrrothine N-acétyltransférases (■) et pyrrothine N-benzoyltransférases (□) au cours de cultures de *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 sur : A. milieu SS, B. milieu SS supplémenté en acide benzoïque à 1,25 mM, C. milieu SS supplémenté en acide acétique à 5 mM. Les activités spécifiques sont exprimées en $\mu\text{U mg}^{-1}$ de protéines et le temps en heures.

L'activité spécifique acétyltransférase augmente rapidement entre 12 et 24 h jusqu'à la valeur maximale de $18823 \mu\text{U mg}^{-1}$ avant de chuter brusquement. Ainsi à 48 h, sa valeur est déjà sept fois plus faible.

L'activité benzoyltransférase est détectée à partir de 24 h et atteint sa valeur maximale de $9450 \mu\text{U mg}^{-1}$ après 48 h de culture alors que l'activité acétyltransférase n'est déjà plus qu'à 40 % de son niveau maximum. Ensuite sa valeur diminue jusqu'à $1760 \mu\text{U mg}^{-1}$ à 84 h. A 96 h, une brève augmentation de l'activité spécifique jusqu'à $3690 \mu\text{U mg}^{-1}$ est observée (Figure IV-8A, Figure V-5B). Par la suite, les valeurs mesurées diminuent de nouveau jusqu'à atteindre la valeur de $1800 \mu\text{U mg}^{-1}$ à 144 h puis restent stable jusqu'à 168 h.

La comparaison des profils d'expression enzymatique indique que les activités spécifiques acétyltransférases et benzoyltransférases n'atteignent pas leur maximum d'expression de manière simultanée. Ainsi, le ratio des deux activités spécifiques n'est pas constant au cours du temps de culture sur milieu SS.

L'activité spécifique acétyltransférase a aussi été comparée à la vitesse de production spécifique de thiolutine (Figure IV-9A.). L'évolution de l'activité spécifique acétyltransférase est étroitement corrélée à l'évolution de la vitesse de production spécifique de thiolutine. Ces deux paramètres atteignent leur valeur maximale simultanément à 24 h puis diminuent jusqu'à 72 h.

De la même manière, la vitesse de production spécifique de BEP est étroitement reliée au niveau de l'activité spécifique benzoyltransférase (Figure IV-9B). Le pic de vitesse de production spécifique de BEP est associé à l'augmentation de l'activité spécifique benzoyltransférase.

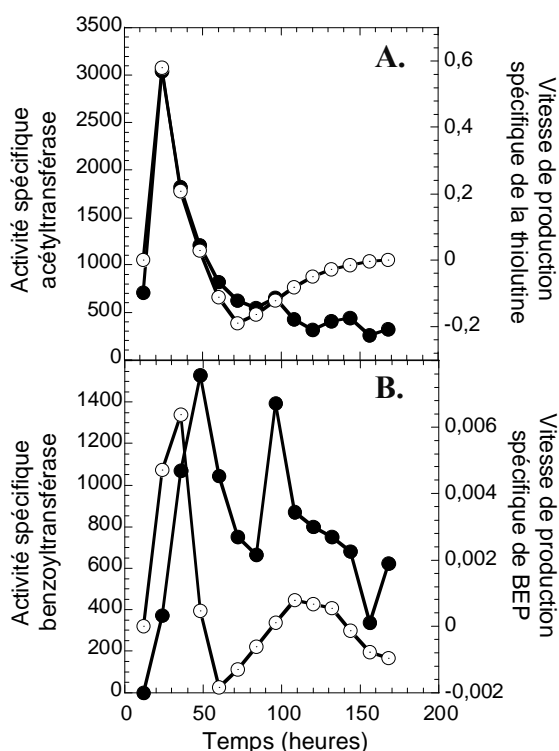


Figure IV-9 Evolution de l'activité spécifique pyrrothine N-acyltransférase (●) et de la vitesse de production spécifique moyenne des dithioloypyrrrolones (○) sur milieu SS : A. Comparaison de l'activité acétyltransférase et de la vitesse de production spécifique moyenne de la thiolutine, B. Comparaison de l'activité benzoyltransférase et de la vitesse de production spécifique moyenne de la BEP. L'activité spécifique pyrrothine N-acyltransférase est exprimée en mU g⁻¹ de MS et les vitesses de production spécifique moyenne des dithioloypyrrrolones en mg h⁻¹ g⁻¹ de MS. Le temps est donné en heure.

IV.5. Expression des activités pyrrothine N-acyltransférases sur milieu SS supplémenté en acides organiques

Les activités spécifiques acétyltransférase et benzoyltransférase ont été quantifiées au cours de cultures de *Sa. algeriensis* sur milieu SS supplémenté en acide benzoïque à 1,25 mM (Figure IV-8B) ou en acide acétique à 5 mM (Figure IV-8C).

Durant la culture sur milieu SS avec de l'acide benzoïque, l'activité spécifique benzoyltransférase est significativement plus élevée que sur le milieu SS mais le profil d'expression n'est pas affecté par l'ajout de l'acide.

L'activité spécifique benzoyltransférase atteint une valeur maximale de 20881 $\mu\text{U mg}^{-1}$ à 48 h, 2,2 fois plus élevée que sans acide benzoïque. Le second pic d'activité spécifique benzoyltransférase, observé à 96 h comme sur milieu SS, culmine à une valeur de 15920 $\mu\text{U mg}^{-1}$, 1,8 fois plus élevée que sans acide benzoïque. Par contre, l'activité spécifique

acétyltransférase n'est pas significativement modifiée par l'ajout d'acide benzoïque au milieu de culture.

Par ailleurs, l'activité spécifique benzoyltransférase a été aussi déterminée dans des extraits cellulaires obtenus après 48 h de croissance sur milieu SS avec différentes concentrations en acide benzoïque (Figure IV-10A). L'activité spécifique benzoyltransférase est deux fois plus élevée quand l'acide benzoïque est ajouté au milieu de culture quelque soit sa concentration dans le milieu de culture de 0,5 à 2,5 mM.

L'évolution de l'activité spécifique acétyltransférase n'est pas significativement modifiée par l'ajout d'acide acétique au milieu de culture. L'activité spécifique acétyltransférase atteint une valeur maximale de 16391 $\mu\text{U mg}^{-1}$ à 24 h. De la même manière, l'acide acétique n'a pas d'effet sur les activités spécifiques benzoyltransférases. Une activité benzoyltransférase maximale de 9840 $\mu\text{U mg}^{-1}$ a été mesurée à 48 h.

L'activité spécifique acétyltransférase a aussi été déterminée dans des extraits cellulaires obtenus après 24 h de croissance sur milieu SS avec différentes concentrations en acide acétique (Figure IV-10B). L'acide acétique n'a pas d'effet sur l'activité acétyltransférase quelque soit la concentration à laquelle il est ajouté entre 2,5 à 7,5 mM.

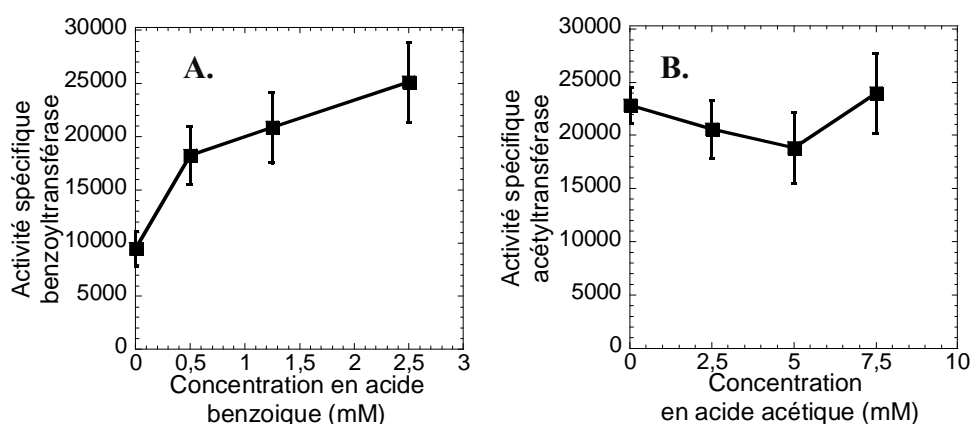


Figure IV-10 Influence de la concentration en acide sur les activités pyrrothine N-acyltransférases : A. Influence de la concentration en acide benzoïque dans le milieu SS sur l'activité spécifique pyrrothine N-benzoyltransférase à 48 h. B. Influence de la concentration en acide acétique dans le milieu SS sur l'activité spécifique pyrrothine N-acétyltransférase à 24 h. Les activités enzymatiques spécifiques sont données en $\mu\text{U mg}^{-1}$ de protéines et les concentrations en acides en mM.

IV.6. Discussion

Sa. algeriensis a la capacité de produire plusieurs dithiolopyrrolones avec différents radicaux acyls R2 liés à l'amine exocyclique, en fonction des précurseurs ajoutés dans le milieu de culture (Lamari *et al.* 2002a, Bouras *et al.* 2006a, Bouras *et al.* 2008). Pour avoir la capacité de produire différentes dithiolopyrrolones avec une grande diversité structurale, ce microorganisme doit posséder non seulement les précurseurs correspondants mais aussi un système enzymatique adapté ayant une flexibilité suffisante pour transférer une grande variété de radicaux R2 sur N₇.

Les résultats présentés indiquent la présence, dans l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis*, d'une activité enzymatique qui catalyse l'acylation du noyau pyrrothine sur N₇ en utilisant des acyls-CoA comme donneurs de groupements acyls. Plus particulièrement, l'acétyl-CoA et le benzoyl-CoA sont respectivement les substrats d'une activité enzymatique pyrrothine N-acétyltransférase et pyrrothine N-benzoyltransférase. Ces résultats suggèrent que la réaction enzymatique d'acylation du noyau pyrrothine fait partie de la voie de biosynthèse des dithiolopyrrolones chez *Sa. algeriensis*. Ainsi cette souche est capable d'utiliser des acyl-CoA avec des structures très différentes (acétyl-CoA et benzoyl-CoA) pour produire les dithiolopyrrolones correspondantes (Thiolutine et BEP). La présence d'une activité enzymatique similaire appelée « holomycine synthase » qui catalyse la formation d'une liaison amide entre l'holothine (deacétyl-holomycine) et l'acétyl-CoA a déjà été observée dans des extraits cellulaires de mutants de *S. clavuligerus* producteurs d'holomycine (De La Fuente *et al.* 2002). Cependant, l'enzyme responsable de cette activité enzymatique n'a pas encore été purifiée. Enfin, l'existence d'une activité N-benzoyltransférase impliquée dans la synthèse des dithiolopyrrolones n'a encore jamais été rapportée dans la littérature.

Pour comprendre les mécanismes de régulation qui s'exercent sur ces activités enzymatiques nouvellement identifiées, les cinétiques d'expression des activités spécifiques pyrrothine N-acétyltransférase et pyrrothine N-benzoyltransférase ont été réalisées et comparées aux cinétiques de croissance, de production de thiolutine et de BEP.

Les données rapportées dans cette étude indiquent tout d'abord que la phase de production des dithiolopyrrolones est partiellement associée à la croissance durant la culture de *Sa. algeriensis* sur milieu SS et qu'elle a lieu pendant une phase de diminution du taux de croissance. Ces résultats contrastent avec l'idée traditionnelle selon laquelle la phase de production, appelée idiophase, se distingue de la phase de croissance, appelée trophophase. Cependant, de nombreuses études ont déjà montré que des conditions de culture supportant

faiblement la croissance, comme des conditions de limitations nutritionnelles, peuvent entraîner une production d'antibiotiques partiellement associée à la croissance (Martin and Demain 1980, Mc Dermott *et al.* 1993, Fazeli *et al.* 1995, Untrau-Taghian *et al.* 1995). Par ailleurs, des études en chemostat de la production d'antibiotiques ont déjà démontré que la production peut avoir lieu en association avec la croissance même si le niveau de production est meilleur à de faibles taux de dilution (Vu-Trong and Gray 1982, Lebrihi *et al.* 1988b, McIntyre *et al.* 1996, Pamboukian and Faciotti 2004).

En outre, une diminution notable de la concentration en thiolutine dans le milieu de culture est observée après 72 h de croissance sur milieu SS. Cette diminution est associée avec une baisse de l'activité antimicrobienne contre *Mucor ramanianus* et *Bacillus subtilis* (Lamari 2006). La thiolutine pourrait subir une transformation chimique ou physique (Yoshioka and Stella 2001). Ce composé contient en particulier un pont disulfure qui pourrait être rompu chimiquement (Parker and Karasch 1959, Kice 1968). La thiolutine pourrait aussi être converti enzymatiquement comme cela a déjà été décrit dans la littérature pour d'autres antibiotiques. La conversion enzymatique pourrait être extracellulaire ou intracellulaire après réassimilation de la thiolutine par les cellules (Argoudelis and Mason 1969, Perlman and Sebek 1971). Cependant, aucun mécanisme de transformation de la thiolutine n'a encore été identifié.

L'activité pyrrothine N-acyltransférase est détectable tout au long de la culture de *Sa. algeriensis* sur milieu SS mais est surexprimée uniquement pendant une très courte période qui coïncide avec le pic de productivité (vitesse de production spécifique) en antibiotiques. De tels profils d'expression ont déjà été observés auparavant pour différentes antibiotique-synthases (Ortmann *et al.* 1974, Nimi *et al.* 1981, Braña *et al.* 1985). C'est l'illustration au niveau biochimique de l'étroite régulation qui s'exerce sur la synthèse d'antibiotiques, largement observée lors de l'étude des gènes de biosynthèse chez les *Streptomyces sp.* (Cundliffe 2006, Rokem *et al.* 2007).

Sa. algeriensis s'est avérée capable de produire de nouveaux dérivés dithiopyrrolones quand des précurseurs sont ajoutés au milieu de culture (Bouras *et al.* 2008). L'ajout d'acides organiques provoque notamment la production de nouvelles dithiopyrrolones possédant des radicaux R2 identiques ou différents de l'acide ajouté. Plus particulièrement, l'ajout d'acide benzoïque ou cinnamique mène à la production de benzoyl-pyrrothine et l'ajout d'acide valérique à la production de valéryl-pyrrothine (Bouras *et al.* 2008).

Notre étude montre que la BEP est produite en faibles quantités sur milieu SS et permet de confirmer que sa production est fortement stimulée par l'ajout d'acide benzoïque à 1,25 mM au milieu de culture. Par ailleurs, la mesure de l'activité spécifique pyrrothine N-benzoyltransférase indique que cette activité spécifique augmente lorsque la croissance a lieu en présence d'acide benzoïque. Cependant l'acide benzoïque n'a pas d'effet activateur de l'activité spécifique benzoyltransférase lorsqu'il est ajouté dans le milieu du dosage quelque soit sa concentration de 1,25 à 5 mM. Ces résultats suggèrent que la stimulation de la production de BEP par l'acide benzoïque n'est pas seulement due à l'apport de précurseurs additionnels mais inclut aussi l'induction d'une activité enzymatique de biosynthèse, la pyrrothine N-benzoyltransférase responsable du transfert du benzoyl-CoA sur la pyrrothine.

D'autres précurseurs d'antibiotiques sont connus pour stimuler la production d'antibiotiques à travers l'induction d'enzymes de la voie de biosynthèse. Un exemple typique est la stimulation de la production de l'alkaloïde de l'ergot par le tryptophane. Krupinsky *et al.* (1976) ont ainsi montré que le tryptophane provoque l'augmentation de la production de l'alkaloïde de l'ergot en induisant la diméthylallyltryptophane (DMAT) synthétase, la première enzyme intervenant dans sa biosynthèse. Par ailleurs, de précédentes études ont aussi démontré que la méthionine, un précurseur de la céphalosporine C chez *Cephalosporium acremonium* induit les enzymes de la voie de biosynthèse telles que la δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthétase (ACVS), l'isopénicilline N synthase et la déacétoxycéphalosporine C synthase (Demain and Zhang 1998). La régulation semble avoir lieu au niveau transcriptionnel puisque la transcription des gènes codant pour ces enzymes augmente fortement lors d'une culture sur méthionine (Demain and Zhang 1998). Enfin, il a aussi été montré que certaines enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse des précurseurs d'antibiotiques, particulièrement le catabolisme des acides aminés, sont induites par leur propre substrat. Rius *et al.* (1996) ont observé que la lysine induit la L-lysine ϵ -aminotransférase (LAT), une enzyme impliquée dans la conversion de la L-lysine (Lys) en acide L- α -aminoadipique (Aaa), un précurseur direct des céphamycines chez *S. clavuligerus*. Par ailleurs, la valine deshydrogénase (VDH), la première enzyme du catabolisme de la valine qui fournit du N-butyrate, du propionate et du méthyl-malonate pour la biosynthèse des macrolides est induite par la valine chez *S. aureofaciens*, *S. fradiae* et *S. avermitilis* (Nguyen *et al.* 1995a, b).

Dans notre étude, l'ajout d'acide acétique à 5 mM dans le milieu de culture provoque une baisse de 67 % de la production spécifique de thiolutine en dépit du fait qu'il peut s'agir

d'un précurseur de la thiolutine. Par ailleurs les dosages de l'activité pyrrothine N-acétyltransférase montrent que l'acide acétique de 2,5 à 7,5 mM n'a pas d'effet sur le niveau de cette activité ce qui indique que la diminution de la production de thiolutine n'est pas due à la répression de l'enzyme impliquée dans la réaction acétyltransférase. Enfin, l'acide acétique n'a pas d'effet inhibiteur sur l'activité acétyltransférase lorsqu'il est ajouté dans le milieu de dosage quelque soit sa concentration de 2,5 à 7,5 mM. Par conséquent, l'effet négatif exercé par l'acide acétique sur la production spécifique de thiolutine reste toujours à éclaircir. Cependant, quelques hypothèses peuvent être avancées concernant les mécanismes en jeu. Les explications possibles incluent l'inhibition de l'activité acétyltransférase par un changement du pH intracellulaire ou l'effet négatif de l'acétate sur des enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse qui fournissent des précurseurs. La modification des systèmes de transport ou la redirection des précurseurs de la thiolutine vers le métabolisme primaire pourraient aussi expliquer une baisse de la production de thiolutine en présence d'acétate mais ces deux cas de figure sont improbables puisque la croissance n'est pas affectée par l'ajout d'acétate.

Enfin, les résultats présentés dans cette étude supportent l'idée que les réactions de transfert de l'acétyl-CoA et du benzoyl-CoA sur la pyrrothine ne sont pas catalysées par la même enzyme. En effet, l'existence d'une unique enzyme ne pourrait pas expliquer la variabilité dans le ratio entre les deux activités spécifiques au cours de la culture. Cette idée est par ailleurs renforcée par l'observation suivante : l'activité benzoyltransférase augmente spécifiquement lors de cultures en présence d'acide benzoïque alors que l'activité acétyltransférase n'est pas modifiée.

En conclusion cette étude apporte la preuve de la présence, dans des extraits cellulaires de *Sa. algeriensis* obtenus après une croissance sur un milieu de base ou supplémenté en acide acétique ou benzoïque, d'une activité pyrrothine N-acyltransférase impliquée dans la voie de biosynthèse des dithiolopyrrolones. Ce travail suggère aussi que l'augmentation de la production de BEP en présence d'acide benzoïque est en partie due à une augmentation de l'activité spécifique pyrrothine N-benzoyltransférase. Par conséquent, cette étude fournit de nouvelles informations sur la synthèse des dithiolopyrrolones et spécialement sur la régulation de cette production mais aussi des outils expérimentaux pour continuer à améliorer notre compréhension de la voie de biosynthèse des dithiolopyrrolones.

CHAPITRE V

Purification partielle de(s) activité(s) pyrrothine N-
acyltransférase(s)

Chapitre V. Purification partielle de(s) activité(s) pyrrothine N-acyltransférase(s)

Une activité enzymatique pyrrothine N-acyltransférase, impliquée dans la biosynthèse des dithiolopyrrolones, a pu être mise en évidence dans l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis* obtenu sur milieu semi-synthétique, supplémenté ou non en acide organique. En particulier, le transfert du groupement acétyl- sur la pyrrothine, catalysé par une activité enzymatique pyrrothine N-acétyltransférase, aboutit à la formation de la thiolutine. Le transfert du groupement benzoyl- sur la pyrrothine, catalysé par une activité enzymatique pyrrothine N-benzoyltransférase, entraîne la synthèse de la benzoyl-pyrrothine. *Sa. algeriensis* possède donc un système enzymatique pyrrothine N-acyltransférase, dit flexible, car il catalyse le transfert de groupements acyls (acétyl-, benzoyl-) présentant une grande variété structurale. Cette flexibilité est-elle le résultat de la faible spécificité d'une enzyme ou de l'existence de deux enzymes à activité acyltransférase ? Les résultats obtenus sur l'étude des activités pyrrothine N-acétyltransférase et N-benzoyltransférase semblent indiquer que deux enzymes différentes prennent en charge ces réactions enzymatiques. Cette hypothèse est d'abord soutenue par le fait que l'ajout d'acide benzoïque induit spécifiquement l'activité pyrrothine N-benzoyltransférase et n'affecte pas l'activité pyrrothine N-acétyltransférase. En outre, le rapport entre les deux activités spécifiques n'est pas constant au cours du temps de culture et cette variabilité est difficilement explicable si une seule et même enzyme réalise les deux réactions enzymatiques.

Pour confirmer l'existence d'au moins deux enzymes impliquées dans la réaction pyrrothine N-acyltransférase chez *Sa. algeriensis* il est nécessaire de purifier les activités enzymatiques détectées dans l'extrait cellulaire. La purification des activités pyrrothine N-acétyltransférase et pyrrothine N-benzoyltransférase a donc été entreprise. Les objectifs sont multiples. Cette purification ne permettra pas seulement de confirmer l'existence de plusieurs enzymes. Elle pourra aussi permettre de caractériser les enzymes impliquées (spécificité, paramètres cinétiques), de synthétiser des dithiolopyrrolones par voie enzymatique à partir de la fraction purifiée et enfin d'obtenir une séquence protéique nécessaire à la recherche des gènes de biosynthèse des dithiolopyrrolones chez *Sa. algeriensis*.

V.1. Evolution des activités acétyltransférase et benzoyltransférase au cours du temps

V.1.1. Conservation de la biomasse à -80 °C

L'activité benzoyltransférase n'est pas sensible à l'étape de congélation/décongélation de la biomasse et à son stockage pendant 1 mois à -80 °C. L'activité acétyltransférase est par contre sensible à un cycle de congélation/décongélation de la biomasse et à son stockage à -80 °C. C'est entre 0 et 6 jours que la plus grande perte d'activité est observée (31 %). L'activité acétyltransférase diminue ensuite de 11 % entre 6 et 12 jours puis reste stable jusqu'à 29 jours (Tableau V-1).

Tableau V-1 Evolution des activités acétyltransférase et benzoyltransférase au cours du temps de conservation de la biomasse (âge 24 h sur milieu SS) à -80 °C. La mesure à T0 est réalisée sur la biomasse avant congélation. Les mesures suivies de * sont réalisées après un cycle congélation-stockage-décongélation.

Temps (jours)	Activité acétyltransférase		Activité benzoyltransférase	
	Activité spécifique ($\mu\text{U mg}^{-1}$ de protéines)	Conservation (%)	Activité spécifique ($\mu\text{U mg}^{-1}$ de protéines)	Conservation (%)
0	69250	100	2305	100
6*	47710	69	2755	120
12*	37307	54	2437	106
29*	40149	58	2317	101

V.1.2. Conservation de l'extrait cellulaire à -80 °C

L'activité benzoyltransférase n'est pas sensible à l'étape de congélation/décongélation de l'extrait et à son stockage pendant 1 mois à -80 °C. L'activité acétyltransférase est par contre sensible à l'étape de congélation/décongélation de l'extrait et à son stockage 6 jours à -80 °C. Une perte de 55 % de l'activité est observable entre 0 et 6 jours. L'activité reste ensuite stable entre 6 et 29 jours de conservation (Tableau V-2).

Tableau V-2 Evolution des activités acétyltransférase et benzoyltransférase au cours du temps de conservation à – 80 °C d'un l'extrait à 1,71 g L⁻¹ de protéines (biomasse âge 24 h sur milieu SS). La mesure à T0 est réalisée sur l'extrait avant congélation. Les mesures suivies de * sont réalisées après un cycle congélation-stockage-décongélation.

Temps (jours)	Activité acétyltransférase		Activité benzoyltransférase	
	Activité spécifique (μU mg ⁻¹ de protéines)	Conservation (%)	Activité spécifique (μU mg ⁻¹ de protéines)	Conservation (%)
0	69250	100	2305	100
6*	31290	45	2320	101
29*	40010	58	2991	130

V.1.3. Conservation de l'extrait cellulaire à 4 °C

L'activité acétyltransférase est très instable à 4 °C. Ainsi, la conservation de l'extrait pendant 24 h à cette température entraîne une perte de 89 % de cette activité. L'effet de la dialyse est mineur par rapport à l'effet température. La modification de l'environnement de la protéine induite par la dialyse entraîne une perte supplémentaire de seulement 3 %.

L'activité benzoyltransférase est elle aussi relativement instable à 4 °C, mais le phénomène est moins important que pour l'activité acétyltransférase. La perte d'activité benzoyltransférase après 24 h de conservation de l'extrait à 4 °C est de 27 %. Cette activité semble par ailleurs plus affectée que l'activité acétyltransférase par la dialyse et le changement d'environnement qu'elle entraîne. La perte supplémentaire due à la dialyse est de 29 % (Tableau V-3).

Tableau V-3 Evolution des activités acétyltransférase et benzoyltransférase au cours du temps de conservation de l'extrait (biomasse âge 48 h sur milieu SS + acide benzoïque à 1,25 mM) à 4 °C avec ou sans inclusion d'une dialyse de l'extrait de 12 h.

Temps (heures)	Protéines (g L ⁻¹)	Activité acétyltransférase			Activité benzoyltransférase		
		Activité spécifique (μU mg ⁻¹ de protéines)	Activité totale (mU)	R (%)	Activité spécifique (μU mg ⁻¹ de protéines)	Activité totale (mU)	R(%)
0	1,65	14370	23,7	100	7370	12,15	100
24	1,12	2370	2,67	11	7860	8,83	73
24 (dont 12 h de dialyse)	0,78	2340	1,82	8	6890	5,34	44

V.1.4. Influence du cocktail anti-protéases

L'ajout du cocktail anti-protéases n'a aucun effet sur l'activité benzoyltransférase initiale et sur sa conservation 24 h à 4 °C. Par contre, l'ajout du cocktail anti-protéases semble entraîner une diminution de l'activité acétyltransférase initiale mais améliore vraisemblablement sa conservation. Globalement l'activité acétyltransférase n'est cependant pas plus élevée à 24 h lorsque le cocktail est ajouté (Figure V-1).

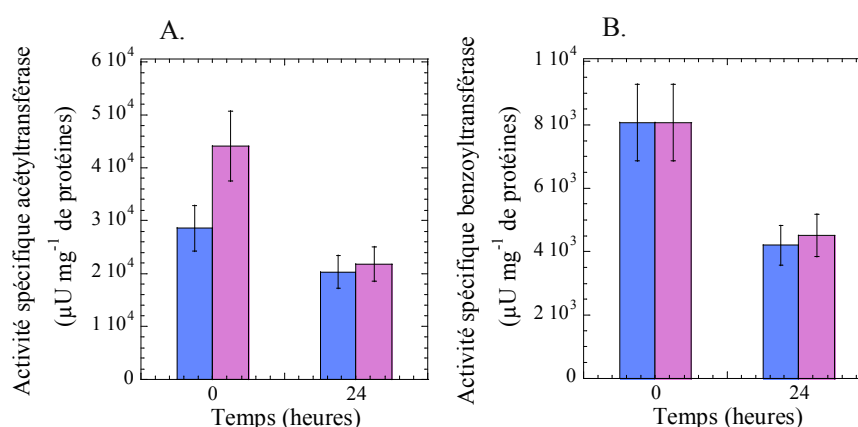


Figure V-1 Influence de l'ajout d'un cocktail anti-protéases au tampon d'extraction sur l'activité acyltransférase initiale et à 24 h (même biomasse extraite, d'âge 24 h sur milieu SS): Activités mesurées en présence du cocktail (■), Activités mesurées en l'absence du cocktail (■). A. Influence sur l'activité acétyltransférase B. Influence sur l'activité benzoyltransférase.

V.2. Détection de l'activité benzoyltransférase sur Native-Page

L'avancement de la purification est évalué en observant le profil protéique des fractions purifiées sur un gel d'électrophorèse. Celui-ci est conventionnellement de type SDS-PAGE, dans des conditions dénaturantes qui permettent d'observer une migration des protéines en fonction de leur taille et d'obtenir une bonne résolution. Dans notre cas il n'est pas possible de localiser les enzymes à purifier sur SDS-PAGE car leur taille et leur nombre de sous-unités ne sont pas connus. Pour permettre le suivi des protéines d'intérêt, un gel de type native-PAGE, réalisé dans des conditions non dénaturantes a donc été réalisé. Dans ces conditions d'électrophorèse l'activité enzymatique peut conserver son activité. La protéine d'intérêt peut donc être localisée par dosage de l'activité enzymatique présente dans le gel.

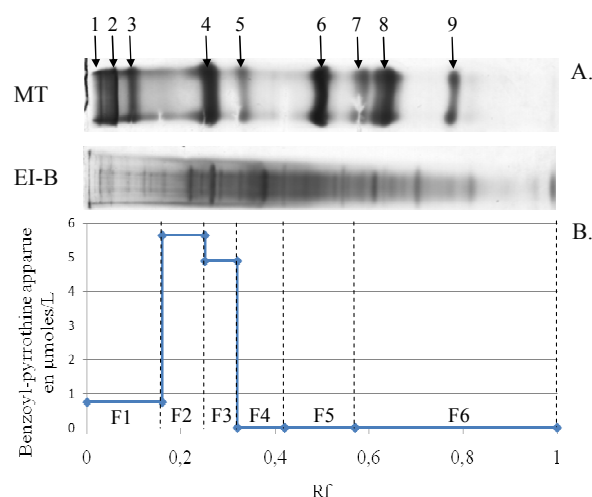


Figure V-2 A. Gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes à T= 10 %. MT : Marqueur de taille composé de myosine (1, 200,000 KDa), β -galactosidase (2, 116,250 KDa), phosphorylase B (3, 97,400 KDa), albumine sérique (4, 66,200 KDa), ovalbumine (5, 45,000 KDa), anhydrase carbonique (6, 31,000), inhibiteur de trypsine (7, 21,500 KDa), lysozyme (8, 14,400 KDa) et aprotinine (9, 6,500 KDa). EI-B : Extrait brut de *Sa. algeriensis* obtenu après 48 h de culture sur milieu SS et acide benzoïque à 1,25 mM (dépôt de 109 μg de protéines - activité benzoyltransférase 1,31 mU). **B.** Activité enzymatique dans les fractions F1 à F6 en fonction de leur Rf. L'activité est exprimée en benzoyl-pyrroline apparue en $\mu\text{moles L}^{-1}$ après 15h d'incubation.

L'activité benzoyltransférase a été localisée sur un gel native-PAGE (réalisé comme décrit dans la section matériel et méthodes) par dosage de plusieurs fractions du gel. L'apparition de benzoyl-pyrroline dans les tests d'activité des fractions F3 et F4, de Rf 0,16 à Rf 0,32, indique la présence d'une activité benzoyltransférase dans cette partie du gel. Bien que la détection de l'activité soit assez peu résolue, il est possible de dire que l'enzyme responsable de l'activité benzoyltransférase migre, dans ces conditions, au niveau de l'albumine sérique du marqueur de taille (Figure V-2).

Aucune activité acétyltransférase n'a par contre pu être détectée dans les conditions de réalisation du gel et des dosages d'activité.

V.3.Optimisation de l'extraction

La technique d'extraction utilisée pour les études d'expression, la méthode Fast prep, ne permet d'obtenir que des volumes d'extrait inférieurs à 1 mL par tube. Par conséquent, une méthode d'extraction des protéines intracellulaire de *Sa. algeriensis* a du être mise en place pour la préparation d'un grand volume d'extrait intracellulaire nécessaire à la purification des activités acyltransférases. L'extraction est réalisée mécaniquement à l'aide d'un broyeur à

bille. La biomasse congelée dans l'azote liquide est broyée dans un godet à l'aide d'une unique bille métallique. Les paramètres d'extraction (temps, quantité de biomasse broyée) ont été optimisés de manière à obtenir une activité volumique maximale.

V.3.1. Influence du temps d'extraction

Tableau V-4 Influence du temps d'extraction au broyeur à bille sur la concentration en protéines et les activités acétyltransférase et benzoyltransférase dans l'extrait. Les extractions sont réalisées sur 6 g de biomasse. Les deux échantillons de biomasse utilisés pour 30 et 60 secondes sont issus de la même production microbiologique et ont subi des lavages et un stockage communs.

Temps d'extraction (sec)	Protéines (g L ⁻¹)	Acétyltransférase		Benzoyltransférase	
		Activité volumique (U L ⁻¹)	Activité spécifique (μU mg ⁻¹ de protéines)	Activité volumique (U L ⁻¹)	Activité spécifique (μU mg ⁻¹ de protéines)
30	3,19	40,5	12680	16,2	5072
60	4,96	61,2	12310	33,7	6800

Après 60 secondes de broyage, la concentration en protéines extraites est 1,5 fois plus élevée qu'après seulement 30 secondes. L'activité volumique acétyltransférase et benzoyltransférase est 1,5 et 2,1 fois plus élevée respectivement. L'activité spécifique acétyltransférase n'est pas significativement modifiée alors que l'activité spécifique benzoyltransférase est 1,35 fois plus élevée. Le temps d'extraction optimal, parmi les deux temps testés, est donc de 60 secondes (Tableau V-4).

V.3.2. Influence de la quantité de biomasse extraite

La quantité de biomasse broyée peut avoir une influence sur les résultats de l'extraction. L'extraction de la biomasse a donc été réalisée sur différentes masses humides de biomasse congelée à l'azote liquide : 6 g, 15 g et 30 g pendant 60 secondes. Le broyat est resuspendu à chaque fois suivant le même ratio de 1 mL de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 pour 0,6 g de biomasse. Ainsi, 6 g de biomasse permettent l'obtention de 10 mL, 15 g de 25 mL et 30 g de 50 mL d'extrait.

Les différentes caractéristiques obtenues pour chaque extrait ont été exprimées en fonction des résultats obtenus sur la même biomasse avec la méthode Fast prep. Ainsi, les

différences observées sont bien liées au paramètre testé et non à la variabilité de la production microbiologique et dans le traitement de la biomasse (Figure V-3).

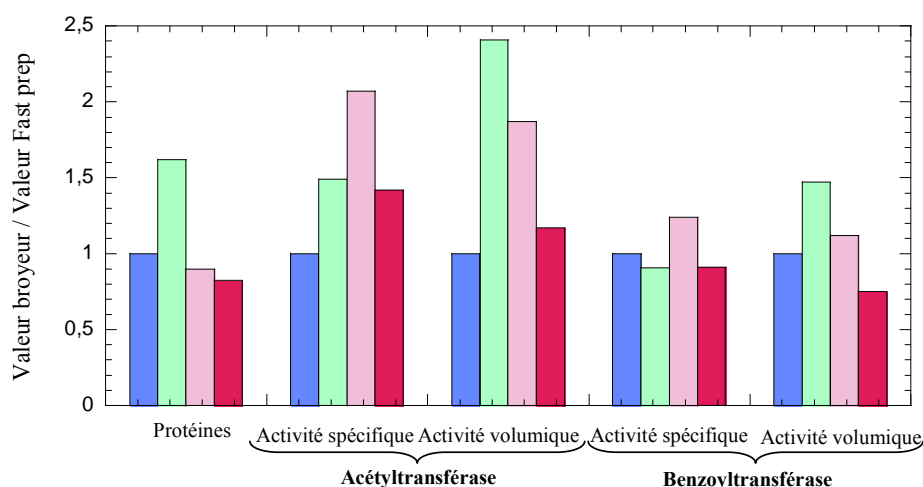


Figure V-3 Concentrations protéiques et activités acétyltransférases et benzoyltransférases obtenues en fonction de la quantité de biomasse extraite : 6 g (■), 15 g (■) ou 30 g (■). Ces différents paramètres sont exprimés par rapport à la valeur obtenue lors de l'extraction au Fast prep (■).

La concentration en protéines totales extraites et les activités volumiques acyltransférases diminuent lorsque la quantité de biomasse extraite augmente. Ces résultats indiquent que la quantité de biomasse optimale pour l'extraction (parmi les valeurs testées) est de 6 g. Cependant, pour limiter le nombre d'extraction nécessaire à l'obtention d'un important volume d'extrait, la quantité de biomasse utilisée lors d'un cycle d'extraction est fixée à 15 g. Dans cette condition, l'activité volumique obtenue est seulement 1,3 fois plus faible qu'avec 6 g de biomasse et en outre l'activité spécifique est maximale.

Les activités spécifiques et volumiques obtenues sont peu différentes de celles obtenues avec la méthode Fast prep en ce qui concerne l'activité benzoyltransférase. Par contre, les activités spécifiques et volumiques acétyltransférases sont respectivement 2,1 et 1,9 fois plus élevées avec la méthode de broyage dite « grande échelle » qu'avec la méthode Fast prep. Les conditions d'extraction lors du broyage grande échelle, en particulier la température plus basse que lors du broyage au Fast prep, permettent vraisemblablement une meilleure conservation de cette activité particulièrement sensible à la température (V.1, p. 121).

L'extraction des protéines intracellulaires de *Saccharothrix algeriensis* a donc été réalisée dans les conditions optimales déterminées ci-dessus. 30 g de biomasse humide ont été broyés 60 sec (en deux fois 15 g) et le broyat a été resuspendu dans 50 mL de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8. Après centrifugation, le surnageant obtenu constitue l'extrait cellulaire utilisé pour la suite de la purification des activités acyltransférases. Il contient 2,65 g L⁻¹ de protéines. Les autres caractéristiques de cet extrait sont présentées en Tableau V-5.

V.4. Optimisation de la précipitation au sulfate d'ammonium

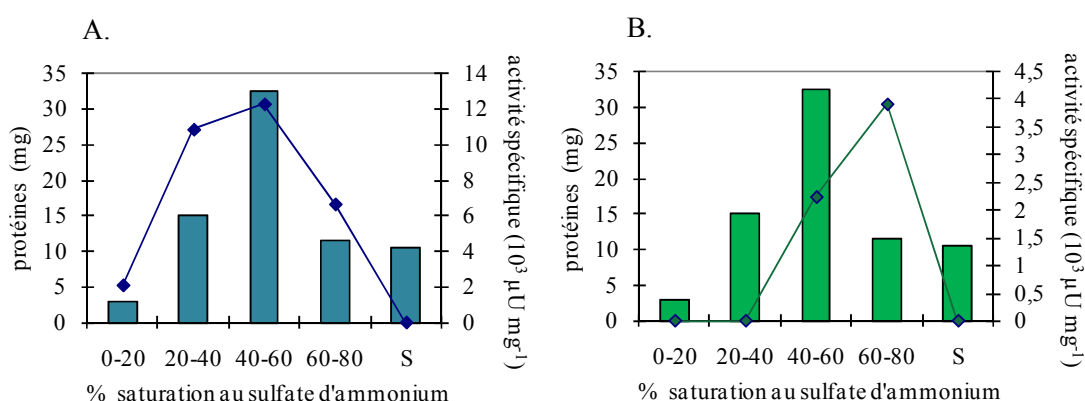


Figure V-4 Protéines totales (■) et activité spécifique acyltransférase (-♦-) en fonction du pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium : A. Activité benzoyltransférase, B. Activité acétyltransférase.

Une précipitation fractionnée des protéines a ensuite été réalisée sur l'extrait cellulaire pour concentrer les protéines d'intérêt. La précipitation a été réalisée avec du sulfate d'ammonium.

L'activité benzoyltransférase, à la fois totale et spécifique, est maximale dans la fraction 40-60 % (Figure V-4A). La purification de l'activité benzoyltransférase sera donc poursuivie à partir de cette fraction. Cette première étape de purification possède un rendement de 27 % et un facteur de purification de 1,26. Elle permet par ailleurs de concentrer 3,4 fois l'activité (Tableau V-5A).

L'activité acétyltransférase totale est maximale dans la fraction 40-60 %. Par contre l'activité spécifique acétyltransférase est maximale dans la fraction 60-80 % où l'activité totale est 1,6 fois plus faible (Figure V-4B). Concernant cette activité, le rendement est inférieur à 1 % et le facteur de purification est inférieur à 1 quelque soit la fraction choisie (40-60 % ou 60-80 %) (Tableau V-5B). Ces mauvais paramètres sont liés à la forte instabilité

de l'activité acétyltransférase même à 4 °C. La stabilité de cette activité doit être améliorée pour poursuivre sa purification.

Tableau V-5 Bilan de purification de l'étape de fractionnement au sulfate d'ammonium pour : A. l'activité benzoyltransférase, B. l'activité acétyltransférase. Le facteur de concentration correspond au ratio activité volumique finale / activité volumique initiale. ND : non détectées.

A.

	Volume (mL)	Protéines totales (mg)	Activité benzoyltransférase totale (mU)	Activité spécifique benzoyltransférase ($\mu\text{U mg}^{-1}$)	R (%)	FP	Facteur de concentration
Extrait brut	58	153,7	1488	9670	-	-	-
Fraction 0-20 %	2,25	2,9	6	2080	0,4	0,22	0,10
Fraction 20-40 %	4,5	14,99	162	10800	10,9	1,12	1,40
Fraction 40-60 %	4,5	32,49	397	12220	26,7	1,26	3,44
Fraction 60-80 %	3,75	11,51	76	6610	5,1	0,68	0,79
Surnageant	121	10,53	ND	ND	0	0	0

B.

	Volume (mL)	Protéines totales (mg)	Activité acétyltransférase totale (mU)	Activité acétyltransférase spécifique ($\mu\text{U mg}^{-1}$)	R (%)	FP	Facteur de concentration
Extrait initiale	58	153,7	2923	18990	-	-	-
Fraction 0-20 %	2,25	2,9	ND	ND	0	0	0
Fraction 20-40 %	4,5	14,99	ND	ND	0	0	0
Fraction 40-60 %	4,5	32,49	73	2230	2,5	0,12	0,02
Fraction 60-80 %	3,75	11,51	45	3900	1,5	0,21	0,02
Surnageant	121	10,53	ND	ND	0	0	0

V.5. Chromatographie d'échange d'anions (AEX)

L'activité benzoyltransférase a ensuite été semi-purifiée par chromatographie d'échange d'anions à partir de la fraction 40-60 % obtenue à l'issue de la précipitation au sulfate d'ammonium. Le chromatogramme obtenu est montré Figure V-5.

La mesure de l'absorbance à 280 nm de l'éluat (qui traduit la quantité de protéines totales dans l'éluat) indique 5 pics d'absorbance. Un premier pic d'absorbance à 280 nm (de 10 à 20 min, valeur maximale de 0,92 U.A.) est observé, après injection de l'échantillon, pendant la phase de lavage de la colonne avec le tampon initial à faible force ionique, Tris-HCl 50 mM pH 8. L'aire de ce pic traduit la quantité de protéines totales non retenues à la colonne. Trois pics d'absorbance à 280 nm, assez peu résolus, sont ensuite visualisés pendant

la phase d'élution avec un tampon à force ionique croissante (Tris-HCl 50 mM pH 8 + 0 à 0,5 M de NaCl). Dans leur ordre d'élution, les trois pics atteignent des valeurs d'absorbance maximales de 0,2, 0,12, et 0,16 U.A. et s'étalent respectivement sur 9, 6 et 18 min. L'aire de ces pics traduit la quantité de protéines éluées durant la phase de séparation. Enfin, un pic d'absorbance à 280 nm (de 56 à 66 min, valeur maximale de 0,52 U.A.) est observé pendant la phase de lavage avec le tampon à forte force ionique (Tris-HCl 50 mM pH 8 + 1 M NaCl). Son aire traduit la quantité de protéines qui sont retenues fortement à la colonne dans les conditions chromatographiques et qui n'ont pas pu être éluées pendant la phase de séparation.

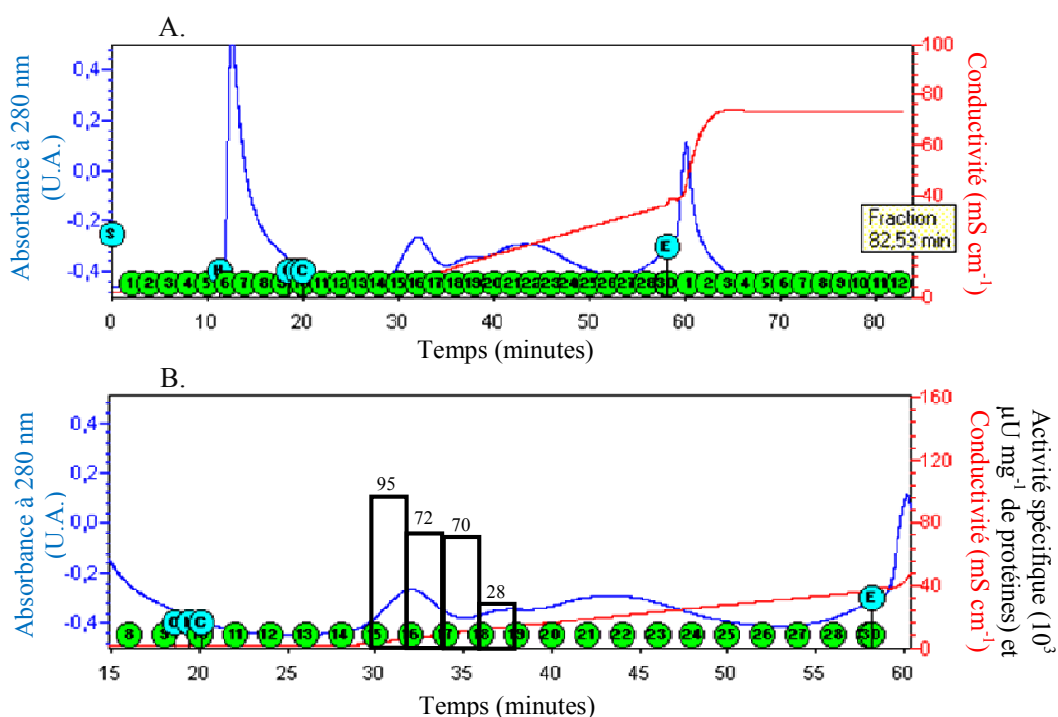


Figure V-5 Chromatographie d'échange d'anions appliquée à la fraction 40-60% : A. Chromatogramme complet, B. Zoom sur le gradient d'élution (Tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 + 0 à 0,5 M de NaCl de 26 à 60 min). La conductivité (--) de l'éluat et son absorbance à 280 nm (---), qui traduit la quantité de protéines totales, sont indiquées. L'activité enzymatique spécifique (□) mesurée dans les fractions est aussi montrée. Le changement de fraction apparaît sous la forme d'une pastille verte.

L'activité benzoyltransférase a été dosée dans l'ensemble des fractions du gradient d'élution (F14 à F31) ainsi que dans les fractions F7 et F32 (Figure V-5A). L'activité enzymatique n'est détectée que dans 4 fractions (F16 à F19) récupérées au début du gradient d'élution (Figure V-5B). En poolant l'ensemble des fractions actives (F16 à F19, pool 2), l'activité benzoyltransférase est récupérée avec un rendement de 32 % et purifiée 5,74 fois à l'issu de l'étape. Le pool 1 (F16 à F18) regroupant les fractions présentant les meilleures

activités spécifiques pourrait aussi être utilisé pour poursuivre la purification. Dans ce cas, le rendement de l'étape est de 26 % et le facteur de purification atteint la valeur de 7,44 (Tableau V-6).

Tableau V-6 Bilan de purification de l'étape d'échange d'ions pour l'activité benzoyltransférase.
Le pool 1 correspond au pool des fractions présentant les meilleures activités spécifiques (F16, F17, F18).
Le pool 2 correspond au pool de l'ensemble des fractions actives (F16, F17, F18, F19).

	Protéines totales (mg)	Activité benzoyltransférase totale (mU)	Activité spécifique benzoyltransférase ($\mu\text{U mg}^{-1}$)	R (%)	FP
Précipitation au (NH_4) ₂ SO ₄ - fraction 40-60 %	20,94	208	9920	-	-
Chromatographie échange d'anion pool 1 (F16 à F18)	0,72	53	73850	26	7,44
Chromatographie échange d'anion pool 2 (F16 à F19)	1,15	66	56980	32	5,74

V.6. Chromatographie d'interactions hydrophobes (HIC)

L'ensemble des fractions actives à l'issu de la chromatographie d'échange d'anions ont été rassemblées et injectées sur une colonne d'interactions hydrophobes pour poursuivre la purification de l'activité benzoyltransférase. Après décongélation du pool actif (mais avant l'échange de tampon), celui possède une activité benzoyltransférase totale de 69,7 mU et une activité spécifique de 79190 $\mu\text{U mg}^{-1}$ de protéines. Le chromatogramme obtenu est montré Figure V-6.

Le suivi de l'absorbance à 280 nm de l'éluat pendant l'étape de chromatographie préparative proprement dite (de 0 à 96 min) indique deux pics. Un premier pic est observé, après l'injection, pendant la phase de lavage avec le tampon à forte force ionique (phosphate de sodium 50 mM + (NH_4)₂SO₄ 0,7 M). Ce pic est élué de 10 à 30 min et il atteint une absorbance maximale de 0,002 U.A. (P1). Son aire traduit la quantité de protéines non retenues à la colonne dans les conditions chromatographiques initiales. Un second pic est détecté pendant le gradient d'élution avec un tampon à concentration en sulfate d'ammonium

décroissante (phosphate de sodium 50 mM + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0,7 M à 0 M) et pendant le lavage avec le tampon à faible force ionique (phosphate de sodium 50 mM). Ce pic s'étale de 45 à 80 min et présente un maximum d'absorbance de 0,006 U.A (P2). Son aire traduit la quantité de protéines retenues à la colonne et éluées par un tampon à force ionique décroissante.

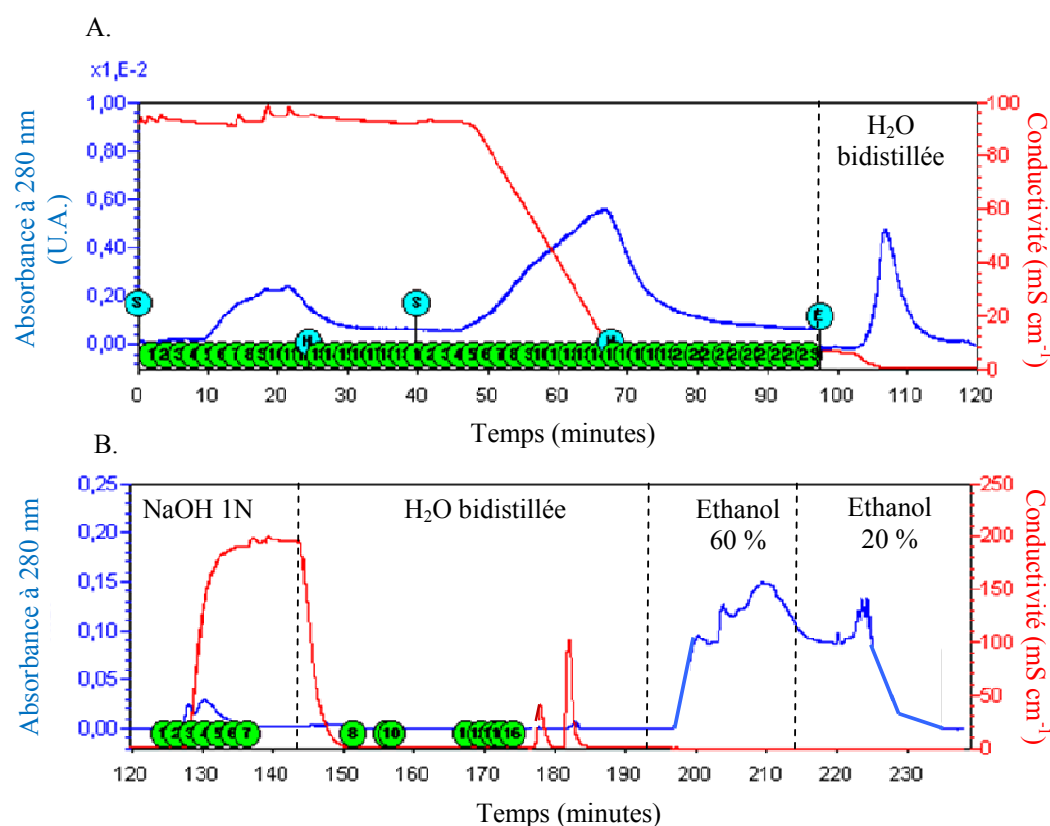


Figure V-6 Chromatographie d'interactions hydrophobes appliquée à l'ensemble des fractions actives à l'issue de l'échange d'anions (F16 à 19): A. 0 à 120 min, B. 120 à 240 min. La conductivité (--) de l'éluat et son absorbance à 280 nm (--), qui traduit la quantité de protéines totales, sont indiquées. Le changement de fraction apparaît sous la forme d'une pastille verte. Le programme de la chromatographie appliqué de 0 à 90 min est détaillé dans le chapitre II. Les différentes phases de lavage de la colonne sont détaillées sur la figure.

Après l'étape de chromatographie préparative (élution dans des conditions non dénaturantes et collection des fractions), la colonne a été lavée à l'eau bidistillée puis avec de l'éthanol, de manière à éluer les protéines fortement retenues à la colonne et qui n'ont pas été éluées même avec le tampon à faible force ionique (phosphate de sodium 50 mM). La colonne a aussi été lavée avec de la soude pour éliminer les protéines qui ont précipité lors de la chromatographie. Ces étapes ne font pas partie du programme de chromatographie. Elles

permettent de régénérer la colonne pour un prochain usage mais les conditions d'élution sont dénaturantes pour les protéines.

Le suivi de l'absorbance à 280 nm de l'éluat lors de ces lavages indique 3 pics d'absorbance regroupant plusieurs pics non résolus. Un premier pic d'absorbance (durée 7 min, valeur maximale de 0,005 U.A.) apparaît pendant le premier lavage à l'eau bidistillée. Un second pic (durée 8 min, valeur maximale de 0,025 U.A.) est élué pendant le lavage au NaOH 1N. Enfin le dernier pic élué pendant le lavage à l'éthanol à 60 % puis 20 % s'étale sur 30 min et atteint une absorbance maximale de 0,15 U.A., 25 fois plus élevée que celle de P2 et 150 fois plus élevée que celle de P1.

Le profil de l'absorbance à 280 nm semble donc indiquer qu'une quantité bien plus importante de protéines est éluée durant les différents lavages successifs que pendant l'étape de chromatographie proprement dite.

L'activité benzoyltransférase a été dosée dans une fraction sur deux du gradient d'élution (F25, 27, 29, 31, 33 et 35) ainsi que dans les fractions F11 et F39 (Figure V-6A) et n'a pu être détectée dans aucune de ces fractions.

V.7. Bilan de purification

Une précipitation au sulfate d'ammonium de l'extrait intracellulaire de *Sa. algeriensis* et une chromatographie d'échange d'anions sur la fraction 40-60 % issue de cette précipitation ont permis de semi-purifier l'activité benzoyltransférase. L'injection des fractions actives à l'issue de l'échange d'anions sur une colonne d'interaction hydrophobe n'a par contre pas permis de récupérer l'activité enzymatique injectée. Un bilan global des deux étapes successives de purification a été dressé en considérant le pool des fractions 16, 17, 18 à l'issue de la chromatographie d'échange d'anions comme fraction semi-purifiée finale (Tableau V-7). Les deux étapes successives de purification ont permis d'obtenir l'activité benzoyltransférase sous une forme semi-purifiée avec un rendement de 3,57 %. Le facteur de purification global est de 7,64.

Tableau V-7 Bilan global de purification de l'activité benzoyltransférase. Le pool 1 correspond au pool des fractions présentant les meilleures activités spécifiques (F16, F17, F18).

	Protéines totales (mg)	Activité benzoyltransférase	Activité spécifique benzoyltransférase	R (%)	FP
Extrait initial	153,7	1488	9670	-	-
Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ - fraction	32,49	397	12220	26,7	-
Chromatographie échange d'anion pool 1	0,72	53	73850	3,6	7,64

Par ailleurs, le gel d'électrophorèse réalisé en conditions non dénaturantes, sur lequel l'activité enzymatique est localisée, indique qu'à ce stade de la purification un grand nombre de protéines contaminantes sont encore présentes avec l'enzyme partiellement purifiée. La bande correspondant à l'enzyme d'intérêt ne peut pas encore être identifiée mais se situe avant l'albumine sérique (66 KDa) (Figure V-7).

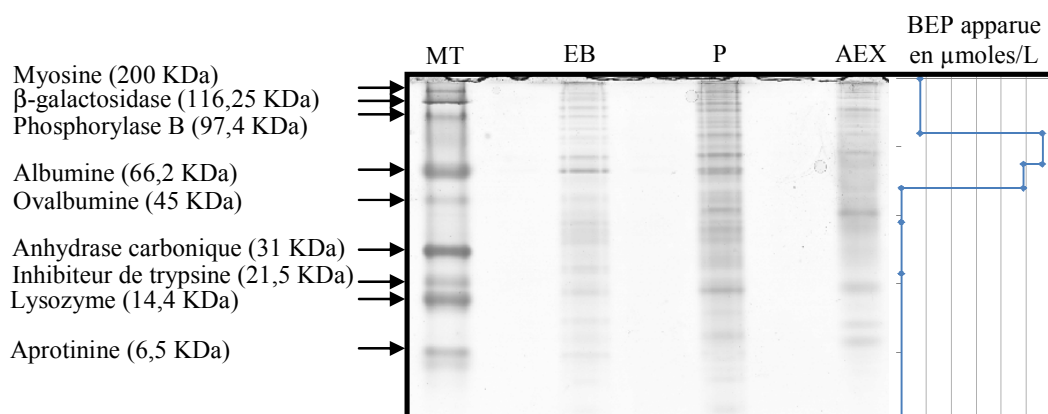


Figure V-7 Gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes à T= 10 %. MT : Marqueur de taille « broad range » de chez Biorad. EB : Extrait brut de *Sa. algeriensis* obtenu après 48 h de culture sur milieu SS et acide benzoïque à 1,25 mM (10 μg). P : Précipitation au sulfate d'ammonium fraction 40-60 % (10 μg). AEX : Fractions actives 16, 17, 18 à la sortie de la chromatographie d'échange d'anion (10 μg). BEP : benzoyl-pyrrothine apparue en μmoles L⁻¹ après 15 h d'incubation des bandes à 30 °C dans le milieu réactionnel (gel antérieur).

V.8. Discussion

La purification des activités enzymatiques pyrrothine N-acétyltransférase et N-benzoyltransférase présentes dans l'extrait intracellulaire de *Sa. algeriensis* a été entreprise. La stabilité de ces activités enzymatiques une fois extraites de leur environnement natif est

essentielle à la réussite du processus de purification. En effet, au cours des différentes étapes de purification, les protéines sont exposées à des conditions pouvant causer leur inactivation (changement de pH, environnement oxydant, protéases, baisse de la concentration protéique...). La stabilité des deux activités enzymatiques a donc été évaluée de manière à adopter les modes de stockage, les choix de tampons et la stratégie de purification les plus judicieux.

La stabilité des activités a été mesurée lors de : la conservation de la biomasse à -80 °C, la conservation de l'extrait intracellulaire à -80 °C et à 4 °C, la dialyse de l'extrait à 4 °C. L'activité benzoyltransférase n'est pas affectée par un cycle de congélation/décongélation et est stable au cours de sa conservation à -80 °C à la fois dans la biomasse ou sous forme d'extrait brut. Par contre l'activité acétyltransférase semble affectée par un cycle de congélation/décongélation et par sa conservation à -80 °C à la fois lorsqu'elle est dans la biomasse et dans un extrait brut. Cependant, les résultats obtenus semblent montrer que cette activité se stabilise après 6 ou 12 jours de conservation en fonction de la forme sous laquelle elle est congelée, extrait ou biomasse respectivement. Par conséquent, la perte maximale d'activité acétyltransférase engendrée par son stockage à -80 °C semble être de 55 ou 45 % de l'activité initiale suivant la forme congelée, extrait ou biomasse, et ce quelque soit la durée de stockage.

Par ailleurs, les tests de stabilité réalisés sur l'extrait intracellulaire à 4 °C indiquent une instabilité importante de l'activité acétyltransférase dans ces conditions (-89 % en 24 h) qui s'avère critique pour sa purification. L'activité benzoyltransférase possède quant à elle une stabilité modérée dans l'extrait intracellulaire à 4 °C (-27 % en 24 h), diminuée par la modification de son environnement (dialyse) (-56 % en 24 h dont 12 h de dialyse). Au vu de ces résultats, il semble que le mode de stockage le plus adapté pour ces activités soit une conservation sous forme congelée à -80 °C quelquesoit la durée de leur stockage. Les échantillons de biomasse et d'extrait doivent cependant être aliquotés pour limiter la perte de l'activité acétyltransférase consécutive à chaque cycle de congélation/décongélation.

En ce qui concerne l'activité acétyltransférase, les conditions doivent être trouvées pour améliorer sa stabilité à 4 °C afin de pouvoir entreprendre sa purification. Pour minimiser son inactivation, un agent réducteur (DTT) et/ou un chélateur de métaux (EDTA) pourraient être ajoutés au tampon de lyse. L'influence de l'agent réducteur sur le pont disulfure des dithiolopyrrolones doit cependant être vérifiée pour ne pas interférer avec les tests d'activités enzymatiques. Par ailleurs, un phénomène de protéolyse dû à l'action des protéases pourrait

être à l'origine de l'instabilité de l'activité acétyltransférase. L'ajout d'un cocktail anti-protéases n'a pas permis une réelle amélioration de la stabilité de cette activité mais d'autres cocktails doivent être testés. Enfin, l'ajout de différents additifs au tampon d'extraction doit aussi être envisagé. Plusieurs enzymes sont en effet stabilisées par l'ajout de leur substrat. Le glycérol ou les sucres (glucose, saccharose) sont également souvent inclus dans les tampons pour minimiser les pertes d'activités enzymatiques. Pour finir, l'ajout de détergents (Tween 20, Triton X-100) peut limiter les pertes dues au phénomène d'adsorption des protéines aux surfaces (Benyon 1989, Harris 1989).

En ce qui concerne l'activité benzoyltransférase il semblerait qu'elle soit sensible à un changement dans son environnement puisque sa stabilité est plus faible lorsque l'extrait est dialysé. La diminution de la concentration en protéines totales dans l'échantillon au cours de la dialyse pourrait être à l'origine de la baisse d'activité observée. Certaines enzymes sont en effet stabilisées par une forte concentration en protéines dans leur environnement. L'activité benzoyltransférase devra donc être maintenue sous une forme concentrée en protéines (Benyon 1989, Harris 1989).

Une étape de concentration au sulfate d'ammonium (récupération de la fraction 40-60 %) suivie d'une étape de chromatographie d'échange d'anions (AEX) ont permis de semi-purifier l'enzyme liée à l'activité benzoyltransférase avec un facteur de purification de 7,64. L'analyse par Native-PAGE de l'enzyme semi-purifiée indique cependant que l'enzyme est loin d'être purifiée à homogénéité. D'autres étapes chromatographiques doivent être menées pour avancer dans la purification. Ces étapes de purification doivent s'effectuer sur d'autres critères de séparation des protéines que leur charge (critère déjà utilisé dans l'AEX), telle que leur hydrophobicité (chromatographie hydrophobe, HIC) ou leur taille (chromatographie de type filtration de gel, GF). Par ailleurs le rendement global de la purification s'avère faible (3,6 %). Ce résultat peut être imputé au fait qu'il s'agit d'une purification de mise au point (volume important d'enzyme dédié à l'analyse, étapes de congélation/décongélation) et que l'ensemble du précipité au sulfate d'ammonium n'a pas été injecté sur AEX. Il pourrait cependant être amélioré en favorisant la stabilité de l'activité benzoyltransférase et en améliorant la stratégie de purification (voir ci-dessous).

Une troisième étape de purification de l'activité benzoyltransférase par chromatographie d'interactions hydrophobes a aussi été entreprise par injection des fractions actives à l'issue de l'échange d'anions. Celle-ci n'a malheureusement pas permis la récupération de l'activité enzymatique injectée. Pourtant, la concentration initiale en sulfate

d'ammonium, 0,7 M soit 16, 5 % de saturation, a été choisie de manière à ne pas faire précipiter les protéines dans le tampon et en particulier la protéine d'intérêt.

L'analyse des protéines totales dans l'éluat (par mesure de l'absorbance à 280 nm) semble indiquer qu'une majorité des protéines injectées n'est pas éluée durant la phase d'élution avec un tampon à force ionique décroissante (phosphate de sodium 50 mM + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,7 à 0 M) et reste retenue à la colonne. Une petite partie des protéines retenues semble être éluée lors des phases de lavage avec l'eau bidistillée et la soude. Une majorité d'entre elles semble être décrochée lors du lavage avec de l'éthanol à 60 et 20 %.

Il est donc possible que dans les conditions chromatographiques utilisées (colonne, concentration en sulfate d'ammonium initiale) l'enzyme d'intérêt, catalysant la réaction benzoyltransférase, ne soit pas éluée dans les fractions collectées mais lors des phases de lavage de la colonne, sans doute parce qu'elle est trop fortement retenue à la colonne.

La seconde hypothèse selon laquelle l'activité enzymatique n'est pas détectable dans les fractions collectées car elle a été perdue durant la chromatographie et la dialyse (du fait de son instabilité à 4 °C et à de faibles concentrations protéiques) ne peut cependant pas être exclue. Pourtant, l'activité totale injectée, 69,69 mU, s'avère bien supérieure à l'activité minimale qui doit être contenue dans la fraction dialysée pour que l'activité soit détectée, 1,32 mU.

La purification de l'activité benzoyltransférase par chromatographie d'interactions hydrophobes devra donc être réitérée. Une activité benzoyltransférase totale plus importante pourra être injectée. Par ailleurs, il serait intéressant d'inclure durant la chromatographie une troisième phase d'élution des protéines avec un tampon contenant une concentration croissante en éthylène glycol (agent qui diminue les interactions hydrophobes). Cette phase supplémentaire d'élution pourrait permettre d'éluer et de récupérer sous forme active les protéines qui ne sont pas éluées avec un tampon à concentration en sulfate d'ammonium décroissante. S'il s'avère que dans les conditions chromatographiques testées (colonne phényl sépharose à forte densité de greffage et $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 0,7 M) l'enzyme d'intérêt est effectivement trop fortement retenue à la colonne pour être éluée sans usage d'additif alors les conditions chromatographiques pourront être modifiées. La concentration initiale en sulfate d'ammonium pourrait être diminuée. Une colonne présentant un autre type de ligand (butyl sépharose) ou bien une densité de greffage plus faible (phényl sépharose à faible densité de greffage) pourrait aussi être utilisée.

Par ailleurs la chromatographie hydrophobe pourrait être réalisée en amont de l'échange d'anions juste après la précipitation au sulfate d'ammonium. En effet, la fraction de précipitation au sulfate d'ammonium 40-60 % serait alors injectée sans dialyse préalable sur HIC alors qu'une dialyse est nécessaire avant l'injection sur AEX.

Enfin, les activités acétyltransférase et benzoyltransférase ont encore montré des comportements différents au cours de cette étude. Leurs profils de précipitation au sulfate d'ammonium se distinguent et l'activité acétyltransférase s'avère nettement plus instable. Ces résultats viennent étayer les études d'expression enzymatique et supporter l'idée que deux enzymes catalysent la réaction étudiée suivant le groupement acyl- à transférer. Cependant les purifications entreprises doivent être poursuivies pour confirmer cette hypothèse.

CHAPITRE VI

Synthèse enzymatique de nouveaux dérivés dithiopyrrolones
par un extrait cellulaire de *Sa. algeriensis*.

Chapitre VI. Synthèse enzymatique de nouveaux dérivés dithiopyrrolones par un extrait cellulaire de *Sa. algeriensis*

La nature des radicaux variables R1 et R2 des dithiopyrrolones influe sur leurs activités biologiques (Oliva *et al.* 2001, Chen *et al.* 2003, Li *et al.* 2007, Guo *et al.* 2008). Il semble donc intéressant de pouvoir produire par voie biologique une grande diversité de dithiopyrrolones présentant une variété de radicaux R1 et R2 et qui pourraient présenter des activités biologiques accrues, innovantes mais aussi de meilleurs index thérapeutiques (ratio de la dose efficace sur la dose toxique). La synthèse enzymatique de dérivés dithiopyrrolones présentant différents radicaux a donc été entreprise.

Les résultats obtenus précédemment indiquent la présence, dans l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis* cultivée sur milieu SS, d'une activité enzymatique qui catalyse l'acylation du noyau pyrrothine sur N₇ en utilisant des acyls-CoA comme donneurs de groupements acyls. Plus particulièrement, l'acétyl-CoA et le benzoyl-CoA sont respectivement les substrats d'une activité enzymatique pyrrothine N-acétyltransférase et pyrrothine N-benzoyltransférase.

La synthèse de nouveaux dérivés dithiopyrrolones par acylation de molécules acceptrices (holothine, pyrrothine) avec différents groupements acyls a été réalisée. Un extrait cellulaire de *Sa. algeriensis* a été utilisé comme catalyseur enzymatique, sous sa forme brute ou sous une forme semi-purifiée.

Au-delà de l'obtention de nouveaux dérivés par voie biologique, cette étude permet de mieux caractériser le potentiel enzymatique de *Sa. algeriensis* pour la synthèse de dithiopyrrolones.

VI.1. Synthèse enzymatique de dérivés pyrrothines avec un extrait cellulaire de *Sa. algeriensis*

VI.1.1.Dérivés obtenus

L'activité enzymatique pyrrothine N-acyltransférase a été dosée dans un extrait cellulaire de *Sa. algeriensis*, obtenu sur milieu SS à 24 h ou 48 h. Dix acyls-CoA différents, dont l'acétyl-CoA et le benzoyl-CoA déjà étudiés, ont été utilisés comme substrats donneurs

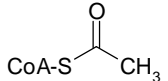
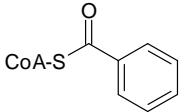
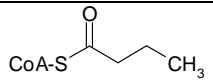
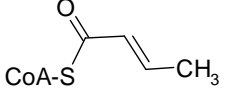
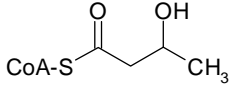
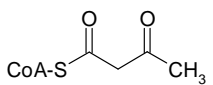
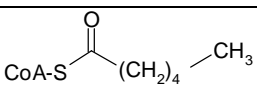
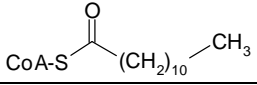
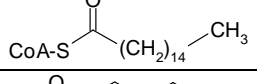
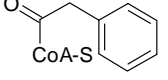
du groupement acyl (Tableau VI-1). Pour 7 des 10 acyls-CoA testés, l'apparition d'un dérivé pyrrothine a pu être détectée par HPLC avec la méthode acétyltransférase ou acyltransférase (paragraphe II.7.3, p.76). Aucune production d'un dérivé pyrrothine n'a par contre été observée en l'absence d'un des éléments du milieu réactionnel : l'acyl-CoA, l'extrait cellulaire ou la pyrrothine. Par conséquent, les activités enzymatiques « pyrrothine N-acyltransférases » correspondants aux produits formés sont présentes dans l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis*.

Le spectre UV et la masse des produits formés permettent de valider leur structure. Le spectre UV est obtenu par analyse HPLC du milieu réactionnel avec un appareil muni d'un détecteur UV à barette de diode. La masse du composé est déterminée après analyse du milieu réactionnel par LC-MS. L'ionisation est réalisée par électrospray (ESI) (paragraphe II.7.3, p.76). Pour chacun des acyls-CoA testés, les caractéristiques spectrométriques du produit formé et les activités spécifiques mesurées sont indiquées en Tableau VI-1. Les spectres de masse obtenus sont présentés en Annexe 7.

Lorsque l'**acétyl-CoA** est utilisé comme substrat, la formation de **thiolutine** dans le milieu réactionnel est confirmée par l'analyse en spectrométrie de masse du pic HPLC élué à $T_r = 13,5$ min. Le spectre de masse indique en effet un pic de ratio m/z 228,9 correspondant à l'ion moléculaire $[M+H]^+$ de la thiolutine de formule brute $C_8H_8N_2O_2S_2$ (m/z calculé de 229,002 pour $[M+H]^+$). Par ailleurs, la présence de l'ion fragment m/z 186,9 est caractéristique des dérivés pyrrothines puisqu'il correspond à la forme protonée du noyau pyrrothine obtenu après la perte du groupement acyl. Enfin, le spectre UV du pic $T_r = 13,5$ min (Tableau VI-1) correspond au spectre UV de la thiolutine précédemment rapporté dans la littérature (Celmer and Solomons 1955, Tableau I-6, p. 22)

L'apparition de BEP lorsque le **benzoyl-CoA** est ajouté au milieu réactionnel est également validée par l'analyse LC-MS. Le produit élué à 29,5 min se ionise en effet en un ion de ratio $m/z = 291,2$ qui concorde avec la masse de l'ion moléculaire de **BEP** ($[M+H]^+$, m/z calculé de 291,018). Enfin, le spectre UV du pic $T_r = 29,5$ min (Tableau VI-1) correspond au spectre UV de la BEP précédemment rapporté dans la littérature, λ max en nm (absorbance relative) : 234 (1,00), 310 (0,52), 399 (0,72) (Bouras *et al.* 2008).

Tableau VI-1 Caractéristiques des dérivés pyrrothines synthétisés: temps de rétention HPLC, spectres UV, masses des ions moléculaires en LC-MS, formules brutes et masse molaires (calculée sur la base des masses atomiques des isotopes majoritaires), noms et activités enzymatiques spécifiques (AS) correspondantes dans un extrait cellulaire de *Sa. algeriensis* obtenu après 24 h ou 48 h de culture sur milieu SS. Les cases vides indiquent l'absence de détection de produits de transformation. * Le spectre UV correspond au pic Tr= 13,5 min, mélange de thiolutine présente dans l'extrait brut et d'acétoacétyl-pyrrothine formée par la réaction enzymatique.

Acyl-CoA	Structure de l'acyl-CoA	Temps de rétention du pic formé (min)	Spectre UV du pic : λ_{max} en nm (absorbance relative)	m/z de l'ion $[M+H]^+$	Formule brut du produit formé (Masse molaire en g mole ⁻¹ *)	Nom du produit formé	AS dans l'extrait à 24 h ($\mu\text{U mg}^{-1}$ de protéines)	AS dans l'extrait à 48 h ($\mu\text{U mg}^{-1}$ de protéines)
Acétyl coenzyme A		13,5	250 (0,58), 316 (0,39), 389 (1)	228,9	C ₈ H ₈ N ₂ O ₂ S ₂ (228,002)	Thiolutine	18823	7456
Benzoyl coenzyme A		29,5	231 (1), 309 (0,45), 401 (0,68).	291,2	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₂ S ₂ (290,018)	Benzoyl-pyrrothine (BEP)	2305	9450
Butyryl coenzyme A		24,8	250 (0,775), 312 (0,6), 393 (1)	257,0	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₂ S ₂ (256,034)	Butyryl-pyrrothine (BUP)	2371	4056
Crotonoyl coenzyme A		24,2	304,4 (0,88), 407 (1)	255,2	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₂ S ₂ (254,018)	Crotonoyl-pyrrothine (CROP)	1066	3050
β -hydroxybutyryl coenzyme A		24,2	303,4 (0,86), 407 (1)	255,0	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₂ S ₂ (254,018)	Crotonoyl-pyrrothine (CROP)	760	1763
Acétoacétyl coenzyme A		13,5	250 (0,79), 313 (0,69), 389 (1)*	271,0	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₃ S ₂ (270,013)	Acétoacétyl-pyrrothine (Acétoacétyl-P)	6777	2306
Hexanoyl coenzyme A		31,5	245 (0,81), 310 (0,58), 392 (1)	285,0	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₂ S ₂ (284,065)	Hexanoyl-pyrrothine (HEP)	969	864
Lauroyl coenzyme A		-	-	-	-	-	-	-
Palmitoyl coenzyme A		-	-	-	-	-	-	-
Phénylacétyl coenzyme A		-	-	-	-	-	-	-

Quatre nouvelles activités acyltransférases ont par ailleurs été détectées avec 5 des acyls-CoA testés.

En présence de **butyryl-CoA**, un produit élué à $T_r = 24,8$ min apparaît linéairement dans le temps sur 10 min. L'analyse en spectrométrie de masse de ce pic indique un ion m/z 257 (pic de base) dont la masse correspond à l'ion $[M+H]^+$ de la **butanoyl-pyrrothine** de formule $C_{10}H_{12}N_2O_2S_2$. Par ailleurs, le pic m/z 187 caractéristique du noyau pyrrothine apparaît sur le spectre. Enfin, le spectre UV du pic $T_r = 24,8$ min, λ_{max} en nm (absorbance relative) : 250 (0,775), 312 (0,6), 393 (1) correspond au spectre UV de la BUP précédemment rapporté dans la littérature (Lamari *et al.* 2002a, Tableau I-6, p. 22). Il existe donc une activité pyrrothine N-butyryltransférase dans l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis*.

Lorsque le **crotonoyl-CoA** est utilisé comme substrat dans le milieu réactionnel, l'aire du pic élué à 24,2 min augmente linéairement avec le temps d'incubation. Ce pic possède le spectre UV, λ_{max} en nm (absorbance relative) : 304 (0,88), 407 (1) qui indique des longueurs d'onde maximales caractéristiques des dithiolopyrrolones (paragraphe I.2.3, p. 21). Par ailleurs, l'analyse en spectrométrie de masse du pic élué à 24,2 min fait apparaître un ion m/z 255,2, dont la masse correspond à l'ion moléculaire $[M+H]^+$ qui serait formé à partir de la **crotonoyl-pyrrothine** de formule $C_{10}H_{10}N_2O_2S_2$ ($[M+H]^+$, m/z calculé de 255,018). Il semblerait donc que le groupement crotonoyl- soit directement transféré sur la molécule de pyrrothine comme c'est le cas pour l'acétyl-, le benzoyl-, ou le butyryl-. Il existe donc une activité pyrrothine N-crotonoyltransférase dans l'extrait brut de *Sa. algeriensis*.

Lorsque le groupement acyl est apporté par l'**hydroxybutyryl-CoA**, un produit apparaît également après incubation du milieu réactionnel. Ce produit possède un temps de rétention et un spectre UV identiques à ceux de la crotonoyl-pyrrothine (CROP) obtenue en présence de crotonoyl-CoA. L'analyse LC-MS du produit formé n'indique pas d'ion pouvant correspondre à l'ion moléculaire de l'hydroxybutyryl-pyrrothine ($[M+H]^+$, m/z calculé 271,021) mais indique par ailleurs un ion de ratio $m/z = 255,0$ qui pourrait être l'ion moléculaire de CROP. Au-delà du pic moléculaire, l'analyse par spectrométrie de masse des produits formés en présence de crotonoyl-CoA et d'hydroxybutyryl-CoA aboutit à des spectres de masse identiques. Les deux spectres présentent le même ion fragment (pic de base) à m/z 237 pouvant correspondre à la perte d'une molécule d'eau ($[M+H]^+ - H_2O$) et un pic de ratio $m/z = 277$ qui semble indiquer la formation d'un adduit sodium ($[M+Na]^+$). Il

semblerait donc que, dans ce cas, le groupement hydroxybutyryl ne soit pas directement transféré sur la molécule de pyrrothine et que le produit formé soit de la **crotonoyl-pyrrothine**. L'hydroxybutyryl- semble subir une déshydratation, ce qui conduit à la formation d'un groupement acyl insaturé, le crotonoyl-.

Lorsque l'**acétoacétyl-CoA** est utilisé comme substrat, un produit apparaît dans le milieu réactionnel après incubation. Il se distingue à l'analyse HPLC par un pic à $T_r = 13,5$ min, le même temps de rétention que celui la thiolutine. L'analyse LC-MS du pic indique un ion peu abondant de ratio $m/z = 271$ qui semble correspondre à l'ion moléculaire de l'acétoacétyl-pyrrothine ($[M+H]^+$, m/z 271,013). Cependant, un ion de ratio m/z 229 (pic de base) est aussi présent sur le spectre. Cet ion peut être formé par protonation de la thiolutine ou bien être un ion fragment ($[M+H]^+ - CH_3CO$) de l'acétoacétyl-pyrrothine. En outre, le fragment caractéristique des dithiopyrrolones m/z 187 ($[M+H]^+ - \text{acyl}$), correspondant à la pyrrothine sous sa forme protonée peut être aussi observé. Dans ce cas, de l'**acétoacétyl-pyrrothine** est donc formée par transfert du groupement acétoacétyl- vers la pyrrothine par une réaction pyrrothine N-acétoacétyltransférase. Cependant de la thiolutine est aussi présente dans le milieu réactionnel puisqu' une petite quantité de thiolutine est apportée par l'extrait cellulaire qui en contient. Par conséquent il ne peut pas être exclu que de la **thiolutine** soit aussi formée au cours de l'incubation du milieu réactionnel par transformation de l'acétoacétyl- en acétyl-.

Lorsque l'**hexanoyl-CoA** est utilisé comme substrat, un produit élué à $T_r = 31,5$ min est formé dans le milieu réactionnel. Le spectre de masse de ce produit indique un pic m/z 285 dont la masse correspond au pic moléculaire $[M+H]^+$ de l'hexanoyl-pyrrothine. En outre, le spectre présente l'ion fils caractéristique $m/z = 187$ correspondant à l'ion moléculaire après la perte du groupement acyl ($[M+H]^+ - C_5H_{11}CO$). Par ailleurs, son spectre UV (Tableau VI-1) est caractéristique des dithiopyrrolones et similaire à celui rapporté dans la littérature pour l'hexanoyl-pyrrothine (= xhénorhabdine IV), λ_{max} en nm : 390, 312, 245 (McInerney *et al.* 1991). De l'**hexanoyl-pyrrothine** est donc formée par transfert du groupement hexanoyl- sur la pyrrothine en présence d'hexanoyl-CoA et il existe dans l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis* une activité enzymatique pyrrothine N-hexanoyltransférase.

Par contre, lorsque le palmitoyl-CoA, le lauroyl-CoA et le phénylacétyl-CoA sont utilisés comme substrats aucun produit de transformation n'est détecté quelquesoit la méthode

HPLC utilisée, la méthode acyltransférase ou la méthode acyltransférase longue (paragraphe II.7.3, p.76). Il semblerait donc qu'il n'y ait pas, dans l'extrait cellulaire testé, d'enzymes capable de transférer les groupements acyls correspondants sur la pyrrothine.

VI.1.2. Cinétique d'expression des activités pyrrothine N-acyltransférases

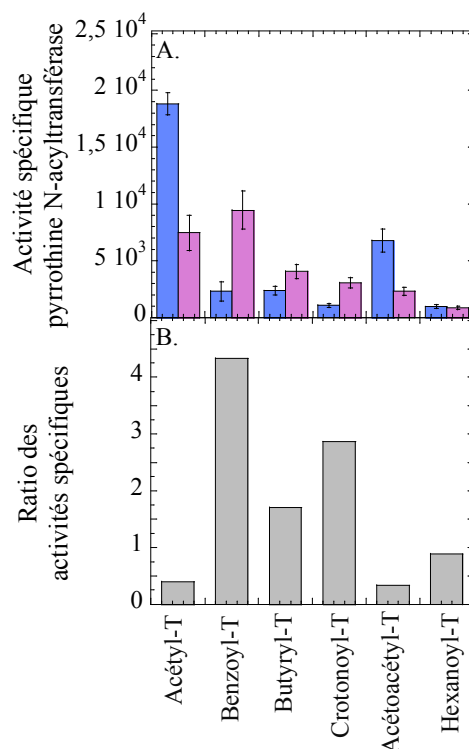


Figure VI-1 Expression des activités pyrrothine N-acyltransférases (Acyl-T). A. Activités spécifiques déterminées dans les extraits bruts obtenus à partir d'une culture de *Sa. algeriensis* sur milieu SS de 24 h (■) et 48 h (■). B. Ratios des activités spécifiques : Activité spécifique dans l'extrait 48h sur l'activité spécifique dans l'extrait 24 h (■). Les activités spécifiques pyrrothine N-acyltransférases sont exprimées en $\mu\text{U mg}^{-1}$ de protéines.

L'étude du ratio de l'activité spécifique 48 h sur l'activité spécifique 24 h (Figure VI-1B) permet de distinguer au moins deux grands groupes d'acyls en ce qui concerne leur transfert sur la pyrrothine :

- Les acyls pour lequel le ratio des activités spécifiques est inférieur à 1 (Groupe1), acétyl-, hexanoyl- et acétoacétyl-. Les activités spécifiques correspondantes sont plus importantes à 24 h qu'à 48 h (Figure VI-1A).

- Les acyls pour lequel le ratio des activités spécifiques est supérieur à 1 (Groupe 2), benzoyl-, butanoyl- et crotonoyl-. Les activités spécifiques correspondantes sont plus importantes à 48 h qu'à 24 h (Figure VI-1A).

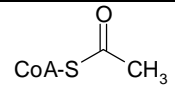
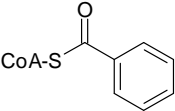
VI.2. Synthèse enzymatique de dérivés holothines avec un extrait cellulaire de *Sa. algeriensis*

L'existence d'une activité enzymatique dans l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis* capable de catalyser le transfert des groupements acyls vers une autre molécule acceptrice que la pyrrothine, l'holothine (déméthyl-pyrrothine), a également été vérifiée. L'activité enzymatique holothine N-acyltransférase a été dosée dans un extrait cellulaire de *Sa. algeriensis*, obtenu après 24 h ou 48 h de culture sur le milieu SS. Les deux substrats modèles l'acétyl-CoA et le benzoyl-CoA ont été utilisés comme donneurs de groupements acyls. Dans les deux cas, une réaction enzymatique a lieu. La quantité de produit formé augmente linéairement dans le temps sur 10 min. Aucune production du dérivé formé n'est par contre observée en l'absence d'un des éléments du milieu réactionnel : l'acyl-CoA, l'extrait cellulaire ou l'holothine. Le spectre UV et la masse des produits formés permettent de valider leur structure. Le spectre UV est obtenu par analyse HPLC du milieu réactionnel avec un appareil muni d'un détecteur UV à barrette de diode. La masse du composé est déterminée après analyse du milieu réactionnel par LC-MS (ionisation réalisée par électrospray) (paragraphe II.7.3, p.76). Pour chacun des acyls-CoA testés, les caractéristiques spectrométriques du produit formé et les activités spécifiques mesurées sont indiquées en Tableau VI-2. Les spectres de masse sont présentés en Annexe 7.

Lorsque le substrat est l'**acétyl-CoA**, le produit qui apparaît est élué à $T_r = 10$ min, un peu avant la thiolutine. L'analyse en spectrométrie de masse de ce pic indique un ion m/z 214,9 dont la masse correspond à l'ion moléculaire de l'holomycine ($[M+H]^+$, m/z calculé 214,987). Par ailleurs, un ion fragment m/z 172,9 apparaît sur le spectre. Ce fragment est caractéristique des dérivés holothines. Il correspond à la forme protonée de l'holothine obtenue après la perte du groupement acyl. Enfin, le spectre UV du dérivé formé, (Tableau VI-2) correspond à celui rapporté par Okamura *et al.* (1977) pour l'holomycine (Tableau I-6, p. 22). Ces résultats indiquent qu'il y a acylation directe du noyau holothine avec le groupement acétyl- de l'acétyl-CoA et formation de la molécule d'**holomycine**. Il y a donc dans l'extrait cellulaire une activité enzymatique holothine acétyl-transférase.

Lorsque le **benzoyl-CoA** est utilisé comme substrat, il y a aussi formation d'un produit élué par HPLC à $T_r = 29$ min. Le spectre de masse indique un pic de ratio m/z 277, pouvant correspondre à l'ion moléculaire de la benzoyl-holothine (ou déméthyl-BEP) ($[M+H]^+$, m/z calculé 277,003). Par ailleurs le spectre UV à $T_r = 29$ min (Tableau VI-2), est identique à celui rapporté par Bouras *et al.* 2008 pour la benzoyl-holothine, λ_{max} en nm (absorbance relative) : 230 (1,00), 304 (0,41), 398 (0,64). La molécule formée correspond donc à la benzoyl-holothine synthétisée par acylation enzymatique de la molécule acceptrice, l'holothine avec le groupement benzoyl- et il existe une activité holothine benzoyltransférase dans l'extrait cellulaire testé.

Tableau VI-2 Caractéristiques des dérivés holothines synthétisés par voie enzymatique : Temps de rétention en HPLC, spectre UV, masse de l'ion moléculaire en LC-MS, formule brute et masse molaire (calculée sur la base des masses atomiques des isotopes majoritaires), nom du produit et activités enzymatiques spécifiques (AS) correspondantes mesurées dans un extrait cellulaire de *Sa. algeriensis* obtenu après 24 h ou 48 h de culture sur milieu SS.

Acyl-CoA	Structure de l'acyl-CoA	Temps de rétention du pic formé (min)	Spectre UV du pic : λ_{max} (absorbance relative)	m/z de l'ion MH^+	Formule brut du produit formé (Masse molaire en g mole ⁻¹)	Nom du produit formé	AS dans l'extrait à 24 h ($\mu\text{U mg}^{-1}$ de protéines)	AS dans l'extrait à 48 h ($\mu\text{U mg}^{-1}$ de protéines)
Acétyl coenzyme A		10	250 (0,6), 300 (0,26), 389 (1)	214,9	$\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ (213,987)	Holomycine	25978	-
Benzoyl coenzyme A		29	229 (1), 304 (0,48), 398 (0,83)	277,0	$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ (276,003)	Benzoyl-holothine ou déméthyl-BEP	-	2653

VI.3. Influence de l'ajout d'acides organiques dans le milieu de culture sur la synthèse enzymatique de nouveau dérivés dithiolopyrrolones

L'absence de plusieurs activités enzymatiques dans l'extrait intracellulaire brut de *Sa. algeriensis* est due à l'absence de synthèse de l'enzyme adaptée sur milieu SS. *Sa. algeriensis* a donc été cultivée en présence de plusieurs acides organiques susceptibles d'entraîner l'induction de ces enzymes. Les activités enzymatiques pyrrothine N-acyltransférases ont ensuite été dosées dans les extraits intracellulaires bruts de *Sa. algeriensis*, cultivée sur les différents milieux de culture.

L'activité enzymatique pyrrothine N-acyltransférase a d'abord été dosée dans l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis* obtenu sur milieu SS supplémenté en acide benzoïque à 1,25 mM après 48 h de culture (extrait brut initial utilisé pour la purification des activités acyltransférases). 10 acyls-CoA différents ont été utilisés comme substrats donneurs du groupement acyl. 6 activités enzymatiques, similaires à celles présentes dans l'extrait cellulaire obtenu sur milieu SS, ont pu être quantifiées (Tableau VI-3). L'usage du crotonoyl-CoA et de l'hydroxybutyryl-CoA entraîne la formation d'un même produit, la crotonoyl-pyrrothine comme avec l'extrait obtenu sur milieu SS. Les activités pyrrothine N-lauroyltransférase, N-palmitoyltransférase et N-phénylacétyltransférase n'ont pas pu être détectées.

L'existence d'une activité pyrrothine N-phénylacétyltransférase, N-lauroyltransférase et N-palmitoyltransférase a ensuite été recherchée dans un extrait cellulaire brut de *Sa. algeriensis* cultivée 24 ou 48 h sur milieu SS supplémenté en acide phénylacétique (0,5 mM), laurique (0,5 mM) ou palmitique (0,5 mM) respectivement. Les extraits obtenus présentent tous des activités pyrrothine N-acétyltransférase et N-benzoyltransférase mais aucune des activités pyrrothine N-phénylacétyltransférase, N-lauroyltransférase ou N-palmitoyltransférase n'a pu être détectée. L'ajout de ces acides organiques à 0,5 mM dans le milieu de culture de *Sa. algeriensis* ne permet donc pas non plus d'induire les activités enzymatiques recherchées.

VI.1. Synthèse enzymatique de dérivés pyrrothines avec l'extrait cellulaire semi-purifié

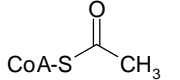
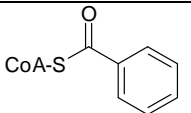
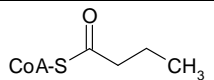
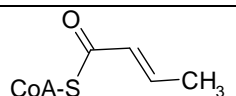
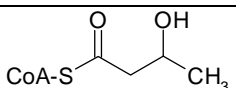
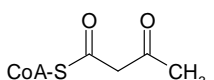
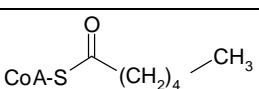
Les activités enzymatiques pyrrothine N-acyltransférases ont ensuite été recherchées **dans la fraction enzymatique (fractions 16 à 18 à l'issue de l'échange d'anion, pool 1)** obtenue dans le Chapitre V p. 120. 7 acyls-CoA différents ont été utilisés comme substrats donneurs du groupement acyl (Tableau VI-3). Le spectre UV et la masse des produits formés ont permis de valider leur structure. Le spectre UV a été obtenu par analyse HPLC du milieu réactionnel avec un appareil muni d'un détecteur UV à barette de diode. La masse du composé a été déterminée après analyse du milieu réactionnel par LC-MS. Les spectres de masse sont présentés en Annexe 8.

Les dosages enzymatiques réalisés indiquent la présence dans l'extrait cellulaire semi-purifié de quatre activités quantifiables, les activités pyrrothine N-benzoyltransférase, N-butyryltransférase, N-crotonoyltransférase et N-hexanoyltransférase et de trois activités non quantifiables mais présentes, les activités pyrrothine N-acétyltransférase, N-hydroxybutyryltransférase et N-acétoacétyltransférase.

Par ailleurs, lorsque l'hydroxybutyryl-CoA est utilisé comme substrat, le produit formé n'est pas le même suivant le catalyseur utilisé (extrait cellulaire brut ou extrait cellulaire semi-purifié). Avec l'extrait brut il y a formation de la crotonoyl-pyrrothine alors qu'avec la fraction semi-purifiée, le produit formé semble être l'hydroxybutyryl-pyrrothine de formule $C_{10}H_{12}N_2O_3S_2$. En effet, le composé formé avec l'extrait cellulaire semi-purifié est élué à 12,6 min et se ionise majoritairement en un ion m/z 273 (pic de base) dont la masse correspond à l'ion moléculaire de l'hydroxybutyryl-pyrrothine ($[M+H]^+$, m/z calculé 273,037).

Enfin, il est à noter que les facteurs de purification obtenus varient suivant l'activité enzymatique considérée. En particulier, il est inférieur à 3 pour les activités pyrrothine N-acétyltransférase et N-acétoacétyltransférase et supérieur à 3 pour les activités pyrrothine N-benzoyltransférase, N-butyryltransférase, N-crotonoyltransférase et N-hexanoyltransférase.

Tableau VI-3 Synthèse enzymatique de dérivés pyrrothine. Synthèses réalisées avec un extrait cellulaire de *Sa. algeriensis* (obtenu après 48 h de culture sur milieu SS supplémenté en acide benzoïque à 1,25 mM) et la fraction enzymatique contenant l'activité benzoyltransférase semi-purifiée (pool 1 issu de la chromatographie d'échange d'anions). FP : facteur de purification.

		Extrait initial			Activité benzoyltransférase semi-purifiée			
Acyl-CoA	Structure de l'acyl-CoA	Nom du produit formé	Activité volumique (U L ⁻¹)	Activité spécifique (μU mg ⁻¹)	Nom du produit formé	Activité volumique (U L ⁻¹)	Activité spécifique (μU mg ⁻¹)	FP
Acétyl coenzyme A		Thiolutine	36,8	14890	Thiolutine	< 0,66	< 8291	< 0,56
Benzoyl coenzyme A		Benzoyl-pyrrothine	30,2	12240	Benzoyl-pyrrothine	7,2	90410	7,4
Butyryl coenzyme A		Butyryl-pyrrothine	21,6	8720	Butyryl-pyrrothine	3,1	39550	4,5
Crotonoyl coenzyme A		Crotonoyl-pyrrothine	16,7	6750	Crotonoyl-pyrrothine	3,7	45930	6,8
β-hydroxybutyryl coenzyme A		Crotonoyl-pyrrothine	8,6	2770	Hydroxybutyryl-pyrrothine	< 0,66	< 8291	-
Acétoacétyl coenzyme A		Acétoacétyl-pyrrothine	8,1	3300	Acétoacétyl-Pyrrothine	< 0,66	< 8291	< 2,51
Hexanoyl coenzyme A		Hexanoyl-pyrrothine	5	2010	Hexanoyl-pyrrothine	0,68	8480	4,22

VI.2. Discussion

Sept dérivés pyrrothines ont pu être synthétisés par acylation du noyau pyrrothine avec des acyls-CoA, en présence d'un extrait cellulaire brut de *Sa. algeriensis* ou d'une forme semi-purifiée de cet extrait : la thiolutine, la benzoyl-pyrrothine (BEP), la butanoyl-pyrrothine (BUP), la crotonoyl-pyrrothine, l'acétoacétyl-pyrrothine, l'hexanoyl-pyrrothine et l'hydroxybutyryl-pyrrothine.

Parmi ces dérivés, 3 ont déjà été isolés de cultures de *Sa. algeriensis*. La **thiolutine**, la **BUP** et la **BEP** sont produites par *Sa. algeriensis* sur milieu SS (Lamari *et al.* 2002 a, b). La production de BUP et de BEP est par ailleurs stimulée respectivement par l'ajout d'acide butyrique et benzoïque à 5 mM au milieu de culture (Bouras *et al.* 2007, 2008). En outre, à l'exception de la BEP, ces dérivés ont d'autres origines bactériennes. La thiolutine a été isolée dans des cultures de différentes espèces de *Streptomyces* : *S. thioluteus*, *S. celluloflavus*, *S. albus*, *S. pimprina*, *S. kasugaensis*, *S. luteoreticuli* (Celmer and Solomons 1955, Yamagishi *et al.* 1971, Furumai *et al.* 1982). La BUP ou xhénorhabdine VII est aussi produite par la bactérie symbiotique des nématodes *Xhenorhabdus bovienii* (Li *et al.* 1995). Les résultats obtenus indiquent la présence dans l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis* d'une activité enzymatique pyrrothine N-acyltransférase nécessaire à la synthèse de chacun de ces composés *in vivo* et notamment une activité pyrrothine N-butyryltransférase dont le rôle n'a encore jamais été mis en évidence dans la synthèse de BUP.

L'**hexanoyl-pyrrothine** a aussi été produite par acylation du noyau pyrrothine avec le groupement hexanoyl- de l'hexanoyl-CoA. Ce composé, aussi appelé xhénorhabdine IV, n'a jamais été isolé de cultures de *Sa. algeriensis* mais a déjà été isolé de cultures de différentes espèces appartenant au genre *Xhenorhabdus* : *X. bovienii*, *Xhenorhabdus sp.*, *X. nematophilus* (Mc Inerney *et al.* 1991, Li *et al.* 1995, Paik *et al.* 2001). Bien que ce composé n'ait pas été isolé d'une culture de *Sa. algeriensis*, il semblerait que la souche étudiée possède l'activité enzymatique pyrrothine N-hexanoyltransférase nécessaire à l'acylation de la pyrrothine avec l'hexanoyl- et donc à la formation de l'hexanoyl-pyrrothine.

Enfin, trois dithiolopyrrolones, encore jamais obtenues par voie microbiologique, ont pu être synthétisées par acylation du noyau pyrrothine avec des acyls-CoA en présence d'un catalyseur enzymatique (extrait cellulaire brut de *Sa. algeriensis* ou une forme semi-purifiée). Il s'agit de la **crotonoyl-pyrrothine**, l'**acétoacétyl-pyrrothine** et l'**hydroxybutyryl-pyrrothine**.

Ce dernier composé est formé uniquement si la réaction est catalysée par l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis* préalablement semi-purifié (purification décrite Chapitre V, p. 120). Lorsque l'extrait intracellulaire brut est utilisé comme catalyseur, l'hydroxybutyryl-CoA entraîne en effet la formation d'une dithiolopyrrolone, la crotonoyl-pyrrothine, dont le radical ne correspond pas au substrat introduit. Il semblerait que le radical acyl, le crotonoyl-, soit formé par déshydratation du radical hydroxybutyryl- (structure des acyls-CoA en Tableau VI-3).

La réaction de déshydratation correspond à l'élimination d'une molécule d'eau et conduit à la formation d'un alcène. La catalyse chimique de cette réaction nécessite des conditions agressives (typiquement H₂SO₄ 50 %, 140 °C) qui ne sont pas réunies dans le cadre du test enzymatique. La réaction est donc probablement catalysée par une enzyme présente dans l'extrait cellulaire brut de *Sa. algeriensis*. Deux enzymes sont susceptibles de réaliser la déshydratation du D,L-β-hydroxybutyryl-CoA en crotonoyl-CoA. L'énoyl-CoA hydratase (EC 4.2.1.17) catalyse, de manière réversible, la déshydratation du (3S)-3-hydroxyacyl-CoA en trans-2(ou 3)-énoyl-CoA et du (3R)-3-hydroxyacyl-CoA en cis-2(ou 3)-énoyl-CoA avec élimination d'une molécule d'eau. Cette enzyme intervient dans le métabolisme du butanoate et plus généralement des acides gras (synthèse et β-oxydation). La 3-hydroxybutyryl-CoA déshydratase (EC 4.2.1.55) catalyse la déshydratation du (3R)-3-hydroxybutanoyl-CoA en crotonoyl-CoA avec rejet d'une molécule d'eau et intervient également dans le métabolisme du butanoate (Moskowitz and Merrick 1969, Agnihotri and Liu 2003). Il semblerait donc que la déshydratation soit antérieure au transfert du groupement acyl- sur la pyrrothine, lorsque le β-hydroxybutyryl- est sous forme de thioester avec le coenzyme A.

Vraisemblablement, la semi-purification de l'activité benzoyltransférase permet d'éliminer l'enzyme catalysant la déshydratation de l'hydroxybutyryl-CoA et de révéler l'existence d'une activité enzymatique hydroxybutyryltransférase dans l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis*.

Il existe aussi une activité **holothine** N-acyltransférase dans l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis* qui permet la synthèse enzymatique d'holomycine et de benzoyl-holothine lorsque l'acétyl-CoA et le benzoyl-CoA sont utilisés comme substrats respectivement. A ce jour ces dérivés holothines n'ont jamais été isolés de cultures de *Sa. algeriensis* sur milieu SS mais la benzoyl-holothine est produite sur milieu SS supplémenté en acide benzoïque (Bouras *et al.*

2008). Par ailleurs l'holomycine est produite par différentes souches de *Streptomyces*: *Streptomyces clavuligerus*, *Streptomyces* sp. P6621 et *Streptomyces griseus* (Okamura *et al.* 1977, Kenig and Reading 1979, Gaeumann *et al.* 1961).

En conclusion, *Saccharothrix algeriensis* possède un système enzymatique suffisamment flexible pour catalyser l'acylation de la pyrrothine avec différents groupements acyls (7) possédant 1 à 7 carbones que ce soit des acyls à chaînes linéaires saturées (acétyl-, butanoyl-, hexanoyl-), insaturées (crotonoyl-), porteuses d'un groupement attracteur en β (acétoacétyl-, hydroxybutyryl) ou un groupement benzoyl-. Les groupements acyls testés possédant plus de 7 carbones, les groupements lauroyl- (C12), palmitoyl- (C16) ou phénylacétyl- (C8) ne sont quant à eux pas transférés sur la molécule acceptrice. Leur transfert n'est pas catalysé par les enzymes prenant en charge les autres substrats sans doute à cause de l'encombrement stérique qu'ils génèrent. En outre, il ne semble pas y avoir d'expression d'un système enzymatique spécifique à ces substrats quelque soit le milieu d'obtention de l'extrait cellulaire. Enfin, il existe aussi une flexibilité du système enzymatique par rapport à la molécule acceptrice puisqu'il existe une activité holothine N-acétyltransférase et N-benzoyltransférase dans l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis*. Cette étude a donc permis d'obtenir par voie enzymatique neuf dérivés dithiolopyrrolones à partir de l'holothine et de la pyrrothine et de mettre en évidence les neuf activités enzymatiques acyltransférases correspondantes.

La flexibilité du système enzymatique peut être attribuée à la faible spécificité des enzymes en jeu ou à leur multiplicité.

Au vu des cinétiques d'expression des activités enzymatiques pyrrothine N-acyltransférases, il est raisonnable de penser qu'**au moins deux enzymes** différentes entrent en jeu dans le transfert de ces acyls sur la pyrrothine comme cela avait déjà été identifié à partir de l'étude des activités acétyltransférase et benzoyltransférase. Le ratio de l'activité spécifique à 48 h sur l'activité spécifique 24 h varie en effet suivant la réaction enzymatique mesurée. Il y a en particulier des ratios inférieurs et supérieurs à 1, ce qui est difficilement compatible avec l'existence d'une seule enzyme qui catalyserait l'ensemble des réactions.

Enfin, bien que les six activités enzymatiques pyrrothine N-acyltransférases détectées dans l'extrait brut soient toujours détectées dans l'extrait semi-purifié, les facteurs de purification diffèrent grandement suivant l'activité considérée. Ce résultat supporte aussi

l'hypothèse suivant laquelle plusieurs enzymes, au moins deux, sont impliquées dans les différentes réactions pyrrothine N-acyltransférases.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Conclusions générales et perspectives

Les dithiopyrrolones suscitent un intérêt important. Ces composés possèdent une activité antibiotique, au sens large, contre les bactéries (Gram positif et négatif), les champignons microscopiques, les protozoaires et les insectes (Gaeumann *et al.* 1961, Otoguro *et al.* 1988, Mc Inerney *et al.* 1991, Oliva *et al.* 2001, Lamari *et al.* 2002, Lamari 2006). Par ailleurs, l'intérêt porté à ces molécules est grandissant depuis qu'on leur a découvert au début des années 2000 des propriétés anticancéreuses (Webster *et al.* 2000, Minamigushi *et al.* 2001)

Enfin, ces composés ont démontré récemment (Guo *et al.* 2008, Guoping and Quanhai 2009) une autre activité biologique d'intérêt : leur capacité à stimuler la synthèse des globules blancs.

Cependant, l'activité biologique des dithiopyrrolones dépend de la nature de leurs radicaux variables. Aujourd'hui, les composés qui semblent les plus prometteurs en termes d'activité anti-cancéreuse possèdent des radicaux R1 et R2 aromatiques. Ils sont produits par voie chimique et n'ont pas d'origine biologique connue (Li *et al.* 2007). La production biologique des dithiopyrrolones doit donc être mieux contrôlée (rendement accru, dirigée vers la synthèse du composé choisi) et permettre de générer une plus grande diversité de dérivés pour représenter une véritable alternative à la synthèse chimique.

Dans ce contexte, *Saccharothrix algeriensis* s'avère une souche particulièrement prometteuse pour la production des dithiopyrrolones par voie biologique. En effet, elle produit sur un milieu de référence plusieurs dithiopyrrolones avec différents radicaux acyls R2 liés à l'amine exocyclique : la thiolutine, la butyryl-pyrrothine, l'isobutyryl-pyrrothine, la sénéciol-pyrrothine, la tigloyl-pyrrothine (Lamari *et al.* 2002) et la benzoyl-pyrrothine. Par ailleurs elle est capable de synthétiser de nouveaux dérivés en fonction des précurseurs (acide organiques) ajoutés au milieu de culture. Ainsi, l'ajout d'acide valérique au milieu de culture permet d'obtenir la valéryl-pyrrothine (Bouras *et al.* 2008).

Malheureusement, malgré l'intérêt suscité par les dithiopyrrolones, très peu de choses sont connues sur la voie de biosynthèse de ces dérivés. Seule une hypothétique voie de biosynthèse a été proposée par Furumai *et al.* (1982). La formation d'une liaison amide entre la pyrrothine et un acide organique activé sous forme d'un acyl-CoA permettrait finalement la synthèse des dithiopyrrolones. Pour permettre la production par voie biologique de nouvelles dithiopyrrolones (nouveaux radicaux R) avec des rendements

accrus, la voie de biosynthèse de ces dérivés et ses mécanismes de régulation a donc été explorée.

Dans cette optique, nous avons étudié la réaction enzymatique d'acylation du noyau pyrrothine, la réaction enzymatique pyrrothine N-acyltransférase, chez *Saccharothrix algeriensis*. Les objectifs étaient multiples : comprendre la capacité de cette souche à produire de nombreuses dithiopyrrolones et à s'adapter à son milieu de culture, générer des nouveaux dérivés par voie enzymatique et obtenir la séquence protéique d'une enzyme de la voie de biosynthèse pour rechercher ensuite les gènes impliqués.

Tout d'abord, la synthèse de la pyrrothine, substrat de la réaction enzymatique pyrrothine N-acyltransférase, s'est avérée être un véritable jalon pour ce projet.

La production semi-biologique de la pyrrothine a d'abord été envisagée. La pyrrothine peut en effet être obtenue par hydrolyse acide ménagée des dérivés dithiopyrrolones obtenus par voie biologique (Pfizer and Co 1956, Celmer *et al.* 1952, Celmer *et al.* 1955). Cependant ce type de production s'est avéré difficile à mettre en œuvre car une importante quantité de dithiopyrrolones est fastidieuse à obtenir par voie biologique en laboratoire. Par ailleurs, la pyrrothine a pu être obtenue mais n'a pas pu être isolée de l'hydrolysate en raison de son instabilité lors des étapes de purification. Ce mode de production de la pyrrothine reste malgré tout envisageable. Cependant, récupérer la pyrrothine sous forme d'un précipité au terme de l'hydrolyse semble à ce jour le seul moyen d'obtenir la pyrrothine sous une forme purifiée. Cela nécessite un plus grand contrôle de l'étape d'hydrolyse dans tous ses aspects : ratio des réactifs, pureté des dithiopyrrolones hydrolysées, température et agitation.

La synthèse chimique de la pyrrothine s'est avérée être une bonne alternative à la synthèse semi-biologique. Sa production par adaptation du protocole de Hjelmgaard *et al.* (2007) nous a permis d'obtenir rapidement (6 semaines) une importante quantité de pyrrothine (100 mg), suffisamment pure pour que sa structure soit confirmée par RMN.

Dans un deuxième temps, une activité enzymatique pyrrothine N-acyltransférase a été mise en évidence dans un extrait intracellulaire brut de *Sa. algeriensis* avec deux substrats modèles l'acétyl-CoA et le benzoyl-CoA. La réaction enzymatique pyrrothine N-acétyltransférase, d'acylation de la pyrrothine avec le groupement acétyl- entraîne la formation de thiolutine. La réaction enzymatique pyrrothine N-benzoyltransférase,

d'acylation de la pyrrothine avec le groupement benzoyl- entraîne la formation de benzoyl-pyrrothine.

Nous avons par ailleurs montré que l'activité pyrrothine N-acyltransférase est détectable tout au long de la culture de *Sa. algeriensis* sur milieu SS mais est surexprimée uniquement pendant une très courte période qui coïncide avec le pic de productivité (vitesse de production spécifique) en antibiotique. Ainsi, l'activité acétyltransférase est maximale à 24 h lorsque la productivité en thiolutine de la souche est maximale. L'augmentation de la productivité en benzoyl-pyrrothine est aussi associée à l'augmentation de l'activité spécifique benzoyltransférase qui atteint sa valeur maximale à 48 h.

Les résultats obtenus montrent également que l'activité spécifique benzoyltransférase est multipliée par deux lorsque de l'acide benzoïque à 1,25 mM est ajouté au milieu de culture. Ces résultats suggèrent que la stimulation de la production de benzoyl-pyrrothine par l'acide benzoïque (production spécifique multipliée par 56) n'est pas seulement due à l'apport de précurseurs additionnels mais inclut aussi l'induction d'une enzyme de biosynthèse à activité pyrrothine N-benzoyltransférase.

Dans un troisième temps, l'activité pyrrothine N-benzoyltransférase a été partiellement purifiée à partir d'un extrait cellulaire brut de *Sa. algeriensis* obtenu sur milieu SS supplémenté en acide benzoïque à 1,25 mM après 48 h. L'activité enzymatique a d'abord été concentrée au sulfate d'ammonium. Elle est récupérée en plus grande proportion dans la fraction 40-60 % avec un rendement de 27 % et un facteur de purification de 1,26. L'activité a ensuite été partiellement purifiée à partir de la fraction 40-60 % par chromatographie d'échange d'anions. Cette étape permet de récupérer, au sein de quatre fractions, 32 % de l'activité benzoyltransférase injectée. Le facteur de purification de l'étape est de 5,74. En conservant les trois fractions présentant les meilleures activités spécifiques, le rendement global de purification de l'activité benzoyltransférase est de 3,57 % et le facteur de purification de 7,64. L'enzyme responsable de l'activité est cependant loin d'être purifiée à homogénéité.

Par ailleurs, nous avons aussi mis en évidence la présence de six activités pyrrothine N-acyltransférases dans l'extrait intracellulaire brut de *Sa. algeriensis* obtenu sur milieu SS: les activités acétyltransférase et benzoyltransférase déjà évoquées mais aussi les activités butyryltransférase, acétoacétyltransférase, crotonoyltransférase et hexanoyltransférase. Ces

activités sont également présentes dans un extrait intracellulaire obtenu sur milieu SS supplémenté en acide benzoïque à 1,25 mM.

L'activité hydroxybutyryltransférase est aussi présente dans l'extrait intracellulaire de *Sa. algeriensis* obtenu sur milieu SS supplémenté en acide benzoïque à 1,25 mM mais elle n'est détectable qu'après semi-purification de l'extrait. L'extrait intracellulaire brut catalyse en effet la réaction parasite de déshydratation de l'hydroxybutyryl-CoA en crotonoyl-CoA et l'usage de l'hydroxybutyryl-CoA comme substrat entraîne dans ce cas la formation de crotonoyl-pyrrothine.

Trois des activités acyltransférases mesurées permettent la formation de dithiolopyrrolones jamais obtenues par voie biologique : l'acétoacétyl-pyrrothine, la crotonoyl-pyrrothine et l'hydroxybutyryl-pyrrothine.

Enfin, différents éléments viennent soutenir l'idée que plusieurs enzymes, au moins deux, sont impliquées dans les activités enzymatiques mises en évidence. D'abord, les activités acétyl- et benzoyltransférase ont montré des profils d'expression différents et le ratio de ces deux activités n'est pas constant au cours du temps de culture. De plus, ces deux activités ont montré des comportements différents lors de leur purification. Ainsi, elles n'ont pas la même stabilité à la température et elles ne précipitent pas aux mêmes pourcentages en sulfate d'ammonium. Enfin, bien que les six activités enzymatiques acyltransférases détectées dans l'extrait brut soient toujours détectées dans l'extrait semi-purifié, les facteurs de purification diffèrent grandement suivant l'activité acyltransférase considérée. Tous ces éléments soutiennent l'hypothèse suivant laquelle au moins deux enzymes (peut être plus) catalysent la réaction d'acylation du noyau pyrrothine chez *Sa. algeriensis*.

A l'issue de cette étude, nous avons donc une meilleure compréhension de l'extraordinaire potentiel de production de dithiolopyrrolones par *Sa. algeriensis*. *Sa. algeriensis* possède un système enzymatique N-acyltransférase, dit flexible, c'est-à-dire qui permet la catalyse d'une grande variété de réaction. Cette flexibilité est-elle le résultat de la faible spécificité d'une enzyme ou de l'existence de plusieurs enzymes à activité acyltransférase ? Nos résultats ne permettent pas de répondre complètement à la question mais il semblerait que l'existence de plusieurs enzymes ne soit pas à exclure. Par ailleurs, *Saccharothrix algeriensis* s'avère capable de réguler son système enzymatique en fonction des acides organiques présents dans le milieu de culture.

La compréhension de la production des dithiopyrrolones chez *Sa.algeriensis* nécessiterait cependant d'autres travaux.

La purification de l'activité benzoyltransférase doit être terminée pour pouvoir confirmer l'existence de plusieurs enzymes catalysant l'acylation du noyau pyrrothine chez *Sa. algeriensis*. Cette purification permettrait de déterminer la spécificité de l'enzyme purifiée. Il serait ainsi possible de savoir si l'enzyme responsable de cette activité présente une très grande spécificité ou bien si elle présente au contraire une grande flexibilité et qu'elle catalyse la réaction d'acylation avec de nombreux substrats. En fonction des résultats obtenus, la purification d'autres enzymes catalysant la réaction pyrrothine N-acyltransférase chez *Saccharothrix algeriensis* pourrait alors être envisagée. Grâce à cette purification une séquence protéique pourrait aussi être obtenue. Cette séquence pourrait permettre de designer des amorces dégénérées et de rechercher par PCR le gène codant pour l'enzyme.

Enfin, des études doivent être menées pour mieux définir les activités biologiques des composés synthétisés par *Sa. algeriensis* et par voie enzymatique. Leur cytotoxicité envers des lignées cellulaires cancéreuses pourrait notamment être déterminée. Par ailleurs, les données toxicologiques sur les dithiopyrrolones sont très peu abondantes dans la littérature bien qu'il semble que ce soit une limitation pour leur usage thérapeutique. Il serait donc important de déterminer pour chaque activité biologique des dithiopyrrolones, l'index thérapeutique des composés c'est-à-dire le ratio entre la dose efficace et la dose toxique et de mener des études pharmacocinétiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

-A-

- Adams C.C. and Gross D.S. (1991) The yeast heat shock response is induced by conversion of cells to spheroplasts and by potent transcriptional inhibitors. *J Bacteriol* **173**, 7429-7435.
- Adhi, T.P., Korus, R.A. and Crawford, D.L. (1989) Production of major extracellular enzymes during lignocellulose degradation by two streptomycetes in agitated submerged culture. *Appl Environ Microbiol* **55**, 1165-1168.
- Agnihotri, G. and Liu, H.-W. (2003) Enoyl-CoA hydratase: reaction, mechanism, and inhibition. *Bioorg Med Chem* **11**, 9-20.
- Aharanowitz, Y. and Demain, A.L. (1977) Influence of inorganic phosphate and organic buffers on cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. *Arch Microbiol* **115**, 169-173.
- Aharonowitz, Y. and Demain, A.L. (1979) Nitrogen nutrition and regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Can J Microbiol*, **25**, 61-67.
- Aharanowitz, Y. (1980) Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Ann Rev Microbiol* **34**, 209-233.
- Al-Mueini, R., Al-Dalali, M., Al-Amri, I.S. and Patzelt, H. (2007) Hydrocarbon degradation at high salinity by a novel extremely halophilic actinomycete. *Environ Chem* **4**, 5-7.
- An, G. and Vining, L.C. (1978) Intracellular levels of guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) and guanosine 5'-triphosphate 3'-diphosphate (pppGpp) in cultures of *Streptomyces griseus* producing streptomycin. *Can J Microbiol* **24**, 502-511.
- Argoudelis, A.D. and Mason, D.J. (1959) Microbial transformation of antibiotics. I. Production of lincomycin sulfoxide and 1-demethylthio-1-hydroxylincomycin by *S. lincolnensis*. *J Antibiot (Tokyo)* **22**, 289-291.
- Asinovskaia, N.K., Lishnevskia, E.B., Belousova, I.I., Bol'shakova, E.N. and Malkov, M.A.. (1985) Inhibition of oleandomycin biosynthesis by glucose. *Antibiot Med Biotechnol*, **30**, 579-584.

- Asturias, J.A., Liras, P. and Martin, J.F. (1990) Phosphate controle of pabS gene transcription during candicidin biosynthesis. *Gene* **93**, 79-84.

-B-

- Badji, B., Mostefaoui, A., Sabaou, N., Lebrihi, A., Mathieu, F., Sequin, E. and Tillequin, F. (2007) Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomuraea* sp. NM94. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**, 403-412.
- Basak, K., and Majumdar, S.K. (1973) Utilization of carbon and nitrogen source by *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin production. *Antimicrob Agents Chemother* **4**, 6-10.
- Basak, K. and Majumdar, S.K. (1975) Mineral nutrition of *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin formation. *Antimicrob Agents Chemother* **8**, 391-395.
- Bascaran, V., Sanchez, L., Hardisson, C. and Braña, A.F. (1991) Stringent response and initiation of secondary metabolism in *Streptomyces clavuligerus*. *J Gen Microbiol* **137**, 1625-1634.
- Behal, V., Gregbova-Prusakova, J. and Hostalek, Z. (1982) Effect of inorganic phosphate and benzyl thiocyanate on the activity of anhydrotetracycline oxygenase in *Streptomyces aureofaciens*. *Folia Microbiol* **27**, 102-106.
- Benyon, R.J. Initial planning: prevention of uncontrolled proteolysis **In:** Protein purification methods: a practical approach. Oxford university press. New York: Harris, E.L.V. and Angal, S., 1989, 317 p.
- Berdy, J. (2005) Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* **58**, 1-26.
- Bergey, D.H. and Holt, J.G. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Eds. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994, 787p..
- Bergmann R. (1989) Thiolutin inhibits utilization of glucose and other carbon sources in cells of *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **55**, 143-152.
- Bhosale, S.H., Rao, M.B. and Deshpande, V.V. (1996) Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol Rev* **60**, 280-300.
- Biffi, G., Boretti G., Di Marco, A. and Pennella, P. (1954) Metabolic behavior and chlortetracycline production by *Streptomyces aureofaciens* in liquid culture. *Appl Microbiol* **2**, 288-293.

- Birch, A., Haüsler, A. and Hütter, R. (1990) Genome rearrangement and genetic instability in *Streptomyces* spp. *J Bacteriol* **172**, 4138-4142.
- Boudjella, H., Bouti, K., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Sabaou, N. (2006) Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharian soil. *Microbiol Res* **161**, 288-298.
- Bouras, N. (2005) Régulation de la production d'antibiotiques dithiolopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL-B 24137. Thèse de doctorat, Université de Toulouse, INP-ENSAT (France), 238 p.
- Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N. and Lebrihi, A. (2006a). Effect of amino acids containing sulfur on dithiolopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *J Appl Microbiol* **100**, 390-397.
- Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N. and Lebrihi A. (2006b). Nutritional requirements for the production of dithiolopyrrolone antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Enzyme Microb Technol* **39**, 1423-1429.
- Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N. and Lebrihi A (2007) Influence on dithiolopyrrolone antibiotic production by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRLB-24137. *Process Biochem* **42**, 925-933.
- Bouras, N., Merrouche, R., Lamari, L., Mathieu, F., Sabaou, N. and Lebrihi, A. (2008) Precursor-directed biosynthesis of new dithiolopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochem* **43**, 1244-1252.
- Bozal, N., Montes, M.J., Miñana-Galbis, D., Manresa, A. and Mercade, E. (2009) *Shewanella vesiculosa* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from an Antarctic coastal area. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 336-340.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Braña, A.F., Wolf, S. and Demain, A.L. (1985) Ammonium repression of cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. *Can J Microbiol*, **31**, 736-743.
- Brown, D., Foster, J., Hitchcock, M.J., Ochi, K., Troost, T. and Katz, E. Regulation of tryptophan metabolism and its relationship to actinomycin D synthesis **In**: Genetics of

industrial microorganisms. Eds Ikeda, Y. and Beppu, T., Konansha Ltd, Tokyo, Japan, 1994, p. 85-91.

- Bu' lock, J.D., Hamilton, D., Hulme, M.A., Powell, A.J., Smalley, H.M., Shepherd, D. and Smith, G.N. (1975) Metabolic development and secondary biosynthesis in *Penicillium urticae*. *Can J Microbiol* **11**, 765-778.
- Büchi, G. and Lukas, G. (1964) A total synthesis of holomycin. *J Am Chem Soc* **86**, 5654-5658.
- Byrne, K.M. and Greenstein, M. (1986) Nitrogen repression of gilvocarcin V production in *Streptomyces arenae* 2064. *J Antibiot (Tokyo)* **39**, 594-600.

-C-

- Carlos, L., Hill, J.S., Wasan, K.M. (2005) Potential role of acyl-coenzyme A:cholesterol transferase (ACAT) inhibitors as hypolipidemic and antiatherosclerosis drug. *Pharm Res* **22**, 1578-1588.
- Castro, J.M., Liras, P., Cortes, J. and Martin, J.F. (1985) Regulation of α -aminoacyl-cysteine-valine, isopenicillin N synthetase, isopenicillin N isomerase and deacetoxycephalosporin C synthetase by nitrogen sources in *Streptomyces lactamdurans*. *Appl Microbiol Biotechnol* **22**, 32-40.
- Celmer, W.D., Tanner, F.W., Harfenist, M., Lees, T.M. and Solomons, I.A. (1952) Characterization of the antibiotic thiolutin and its relationship with aureothricin. *J Am Chem Soc* **74**, 6304-6305.
- Celmer, W.D. and Solomons, I.A. (1955) The structures of thiolutin and aureothricin, antibiotics containing a unique pyrrolinonodithiole nucleus. *J Am Chem Soc* **77**, 2861-2865.
- Chang, Z. and Vining, L.C. (2002) Biosynthesis of sulfur containing amino acids in *Streptomyces venezuelae* ISP5230: roles for cystathionine β -synthase and transsulfuration. *Microbiology* **148**, 2135-2147.
- Chakraborty, R. and Bibb, M. (1997) The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *J Bacteriol* **179**, 5854-5861.
- Chatterjee, S. And Vining, L.C. (1982a) Catabolite repression in *Streptomyces venezuelae*. Induction of β -galactosidase, chloramphenicol production, and

intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentrations. *Can J Microbiol* **28**, 311-317.

- Chatterjee, S. and Vining, L.C. (1982b) Glucose suppression of β -glucosidase activity in a chloramphenicol-producing strain of *Streptomyces venezuelae*. *Can J Microbiol* **28**, 593-599.
- Chen, G., Li, J., Webster, J. and Li B. Patent US2006074125. April 6th 2006.
- Choi, D.B., Park, Y. and Okabe, M. (1998) Effects of rapeseed oil or activity of methylmalonyl-CoA carboxyltransferase in culture of *Streptomyces fradiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**, 902-906.
- Chouayekh, H. and Virolle, M.-J. (2002) The polyphosphate kinase plays a negative role in the control of antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Mol Microbiol* **43**, 919-930.
- Cole, M. and Rolinson, G.N. (1972) Microbial metabolites with insecticidal properties. *Appl Microbiol* **24**, 660-662.
- Collins, L.A. and Franzblau, S.G. (1997) Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 1004-1009.
- Colombo, A.L., Crespi-Perellino, N. and Micalizio, S. (1982) Relationships between growth, cyclic AMP and tylosin production in two mutants of *Streptomyces fradiae*. *Biotechnol Lett* **4**, 747-752.
- Cortès, J., Liras, P., Castro, J.M. and Martin, J.M. (1986) Glucose regulation of cephamycin biosynthesis in *Streptomyces lactamdurans* is exerted on the formation of alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine and deacetoxycephalosporin C synthase. *J Gen Microbiol* **132**, 1805-1814.
- Cross, T. (1981) Aquatic actinomycetes : a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *J Appl Bacteriol* **50**, 397-423.
- Cundliffe, E. (2006) Antibiotic production by actinomycetes: the janus faces of regulation. *J Ind Microbiol Biotechnol* **33**, 500-506.

-D-

- Davis, B.J. (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann NY Acad Sc* **121**, 404-427.
- De la Fuente, A., Lorenzana L.M., Martin, J.F. and Liras P. (2002). Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathway. *J Bacteriol* **184**, 6559-6565.
- Dekleva, M.L., Titus, J.A. and Strohl, W.R. (1985) Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peuceticus* in a defined medium. *Can J Microbiol* **31**, 287-294.
- Demain, A.L. (1999) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**, 455-463.
- Demain, A.L. and Inamine, E. (1970) Biochemistry and regulation of streptomycin and mannosidostreptomycinase (α -D-mannosidase) formation. *Bacteriol rev* **34**, 1-19.
- Demain, A.L. and Fang, A. (1995) Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes. *Actinomycetologica* **9**, 98-117.
- Demain, A.L. and Zhang, J. (1998) Cephalosporin C production by *Cephalosporium acremonium*: the methionine story. *Crit Rev Biotechnol* **18**, 283-294.
- Dommergues, Y. et Mangenot, F. Ecologie microbienne du sol. Paris : Masson et Cie, 1970, 796 p.
- Doull, J.I., and Vining, L.C. (1990) Nutritional control of actinothodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): suppressive effects of nitrogen and phosphate. *Appl Microbiol Biotechnol* **32**, 449-454.
- Dulaney, E.L. (1948) Observations on *Streptomyces griseus* II. Nitrogen sources for growth and streptomycin production. *J Bacteriol* **56**, 305-313.
- Dyson, P. and Schrepf, H. (1987) Genetic instability and DNA amplification in *Streptomyces lividans* 66. *J Bacteriol* **169**, 4796-4803.

-E-

- Elliot, M., Damji, F., Passantino, R., Chater, K. and Leskiw, B. (1998) The *bld* gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2) : a regulatory gene involved in morphogenesis and antibiotic production. *J Bacteriol* **180**, 1549-1555.
- Ellis, J. E., Fried, J. H., Harrison, I. T., Rapp, E. and Ross, C. H. (1977) Synthesis of holomycin and derivatives. *J Org Chem* **42**, 2891-2893.
- Escalante, L., Gonzalez, R., Obregon, A.M. and Sanchez, S. (1992) Carbon catabolite regulation of gentamicin formation. *J Antibiot (Tokyo)* **45**, 465-469.
- Euzéby, J.P. List of prokaryotiks names with standing in nomenclature [en ligne], disponible sur <http://www.bacterio.cict.fr/> (consulté le 6/08/09).

-F-

- Farrel, S.O., Fiol, C.J., Reddy, J.K. and Bieber, L.L. (1984) Properties of purified carnithine acyltransferase of mouse liver peroxisomes. *J Biol Chem* **259**, 13089-13095.
- Fazeli, R.M., Cove, J.H. and Baumberg, S. (1995) Physiological factors affecting streptomycin production by *Streptomyces griseus* ATCC 12475 in batch and continuous culture. *FEMS Microbiol Lett* **126**, 55-61.
- Furumai, T., Takeda K. and Okanishi M. (1982). Function of plasmids in the production of aureothricin. I. Elimination of plasmids and alteration of phenotypes caused by protoplast regeneration in *Streptomyces kasugaensis*. *J Antibiot (Tokyo)* **35**, 1367-1373.

-G-

- Gaeumann, E., Prelog, V. and Visser, E. Holothin and derivatives thereof. Patent US3014922. 26th December 1961.
- Gallo, M. and Katz, E. (1972) Regulation of secondary metabolite biosynthesis: catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose. *J Bacteriol* **109**, 659-667.

- Gersch, D., Roemer, W., Bocker, H. and Thrum, H. (1978) Variations in cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in antibiotic producing strains of *Streptomyces hygroscopicus*. *FEMS Microbiol Lett* **3**, 39-41.
- Gersch, D., Shurk, A. and Römer, W. (1979) Phosphate inhibition of secondary metabolism in *Streptomyces hygroscopicus* and its reversal by cyclic AMP. *Arch Microbiol* **121**, 91-96.
- Gil, J.A. and Campelo-Diez, A.B. (2003) Candicidin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 633-642.
- Gomes, R.C., Semedo, L.T.A.S., Soares, R.M.A., Alviano, C.S., Linhares, L.F. and Coelho, R.R. (2000) Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. *Lett Appl Microbiol* **30**, 146-150.
- Godfrey, C.R.A. Fungicides and bactericides **In**: Agrochemicals from natural products. Ed Godfrey, C.R.A., 1994, p.332. ISBN: 0824795539
- Godfrey, C.R.A. and Dell, I.T. Fungicidal dithiolopyrrolones. Patent GB2173499. 15th October 2006.
- Goodfellow, M. and Williams, S.T. (1983) Ecology of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol* **37**, 189-216.
- Gopalkrishnan, K. S. and Jump, J. A. (1952) The antibiotic activity of thiolutin in the chemotherapy of the *Fusarium* wilt of tomatoes. *Phytopathology* **42**, 338-340.
- Gottschalk, G. (1969) Partial purification and some properties of the (R)-citrate synthase from *Clostridium acidi-urici*. *Eur J Biochem* **7** 301-306.
- Grigorevski de Lima, A.L., Pires do Nascimento, R., Da Silva Bon, E.P. and Coelho, R.R.R. (2005) *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. *Enzyme Microb Technol*, **37**, 272-277.
- Grigull, J., Mnaimneh, S., Pootoolal, J., Robinson, M.D. and Hughes, T.R. (2004) Genome-wide analysis of mRNA stability using transcription inhibitors and microarrays reveals posttranscriptional control of ribosome biogenesis factors. *Mol Cell Biol* **24**, 5534-5547.
- Grund, E. and Kroppenstedt, R.M. (1989) Transfer of five *Nocardioopsis* species to the genus *Saccharothrix*. *Syst Appl Microbiol* **12**, 267-274.
- Guo, Y., Chen, G. and Li, B. Dithiolopyrrolone compounds and their therapeutic applications. Patent WO2008038175. 3rd April 2008.

- Guoping, W. and Quanhai, L. Dithiolopyrrolone compounds, the preparation and the use thereof. Patent WO2009033396. 19th March 2009.
- Gutierrez, S., Velasco, J., Fernandez, F.J. and Martin, J.F. (1992) The *cefG* gene of *Cephalosporium acremonium* is linked to the *cefEF* gene and encodes a deacetylcephalosporin C acetyltransferase closely related to homoserine O-acetyltransferase. *J Bacteriol* **174**, 3056-3064.

-H-

- Hagio, K. and Yoneda, N. (1974) Total synthesis of holomycin, thiolutin and aureothricin. *Bull Chem Soc Jpn* **47**, 1484-1489.
- Hakvag, S., Fjaervik, E., Josefsen, K.D., Ian, E., Ellingsen, T.E. and Zotchev, S.B. (2008) Characterization of *Streptomyces* spp. isolated from the sea surface microlayer in the Trondheim fjord, Norway. *Mar Drugs* **6**, 620-635.
- Hall, M.J. and Hassal, C.H. (1970) Production of the monamycins, novel depsipeptide antibiotics. *Appl Microbiol* **19**, 109-112.
- Harris, E.L.V. Initial planning: purification strategy **In:** Protein purification methods: a practical approach. Oxford university press. New York: Harris, E.L.V. and Angal, S., 1989, 317 p.
- Hayakawa, M. (2008) Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil. *Actinomycetologica* **22**, 12-19.
- Hjelmgaard, T., Givskov, M. and Nielsen, J. (2007) Expedient total synthesis of pyrrothine natural products and analogs. *Org Biomol Chem* **5**, 344-348.
- Holt, J.G. Bergey's manual of systematic bacteriology vol 4. Williams, S.T. and Sharp, M.E. editors. Baltimore: Williams and Wilkins, 1989.
- Horinouchi, S., Ohnishi, Y., and Kang, D.-K. (2001) The A-factor regulatory cascade and cAMP in the regulation of physiological and morphological development in *Streptomyces clavuligerus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **27**, 177-182.
- Hostalek, Z. (1964) Relationship between the carbohydrate of *Streptomyces aureofaciens* and the biosynthesis of chlortetracycline. I. The effect of interrupted aeration, inorganic phosphate and benzyl thiocyanate on chlorotetracycline biosynthesis. *Folia Microbiol* **9**, 78-86.

- Hoyt, S. and Jones, G.H. (1999) *relA* is required for actinomycin production in *Streptomyces antibioticus* **181**, 3824-3829.
- Hsieh, P.-C., Siegel, S.A., Rogers, B., Davis, D. and Lewis, K. (1998) Bacteria lacking a multidrug pump: a sensitive tool for drug discovery. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 6602-6606.
- Hu, Y.T., Zhou, P.J., Zhou, Y.G., Liu, Z.H. and Liu, S.J. (2004) *Saccharothrix xinjiangensis* sp. nov., a pyrene-degrading actinomycete isolated from Tianchi Lake, Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 2091-2094.

-I-

- Iida, T., Moteki, Y., Nakamura, K., Tagushi, K., Otagiri, M., Asanuma, M., Dohmae, N., Usami, R. and Kudo, T. (2009) Functional expression of three rieske non-heme iron oxygenases derived from actinomycetes in *Rhodococcus* species for investigation of their degradation capabilities of dibenzofuran and chlorinated dioxins. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 822-827.
- Ikeda, H., Kotaki, H., Tanaka, H. and Omura, S. (1988) Involvement of glucose catabolism in avermectin production by *Streptomyces avermitilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **32**, 282-284.
- Inoue, O. O., Netto, W., S., Padilla, G. and Facciotti, M.C.R. (2007) Carbon catabolite repression of retamycin production by *Streptomyces olindensis* ICB20. *Braz J Microbiol* **38**, 58-61.
- IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) Enzyme nomenclature [en ligne], disponible sur <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> (consulté le 5/08/09).

-J-

- Janssen, D.B., Dinkla, I.J.T., Poelarends, G.J. and Terpstra, P. (2005) Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. *Environ Microbiol* **7**, 1868-1882.

- Jimenez, A., Tipper, D.J. and Davies, J. (1973) Mode of action of thiolutin, an inhibitor of macromolecular synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* **3**, 729-738.
- Jordan, M.J. and Lechevalier, M.P. (1975) Effects of zinc smelter emissions on forest soil microflora. *Can J Microbiol* **21**, 1855-1865.
- Joshi, A., Verma, M. and Chakravorty, M. (1982) Thiolutin-resistant mutants of *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother* **22**, 541-547.

-K-

- Kang, D.-K., Li, X.-M., Ochi, K. and Horinouchi, S. (1999) Possible involvement of cAMP in aerial mycelium formation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* **145**, 1161-1172.
- Khaoua, S., Lebrihi, A., Germain, P. and Lefebvre, G. (1991) Cephamycin C biosynthesis in *Streptomyces cattleya*: nitrogen source regulation. *Appl Microbiol Biotechnol* **35**, 253-257.
- Kenig, M. and Reading, C. (1979) Holomycin and an antibiotic (MM 19290) related to tunicamycin, metabolites of *Streptomyces clavuligerus*. *J Antibiot (Tokyo)* **32**, 549-554.
- Khachatourians, G.G. and Tipper, D.J. (1974a) *In vivo* effect of thiolutin on cell growth and macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **6**, 304-310.
- Khachatourians, G.G. and Tipper, D.J. (1974b) Inhibition of messenger ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli* by thiolutin. *J Bacteriol* **119**, 795-804.
- Khokhlov, A.S., Tovarova, I.I., Borisova, L.N., Pliner, S.A., Shevchenko, L.A., Kornitskaya, E.Y., Ivkina, N.S. and Rapoport, I.A. (1967) The A-factor, responsible for streptomycin biosynthesis by mutant strains of *Actinomyces streptomycini*. *Dokl Akad Nauk SSSR* **177**, 232-235.
- Kice, J.L. (1968) Electrophilic and nucleophilic catalysis of the scission of the sulfur-sulfur bond. *Acc Chem Res* **1**, 58-64.
- Kinoshita, N., Igarashi, M., Ikeno, S., Hori, M. and Hamada, M. (1999) *Saccharothrix tangerinus* sp. nov., the producer of the new antibiotic formamycin: taxonomic studies. *Nippon Hosenkin Gakkaishi* **13**, 20-31.

- Kobayashi, M., Nagasawa, T. and Yamada, H. (1992) Enzymatic synthesis of acrylamide: a success not yet over. *Trends Biotechnol* **10**, 402-408.
- Krupinski, V. M., Robbers, J. E. and Floss, H.G. (1976) Physiological study of ergot: induction of alkaloid synthesis by tryptophan at enzymatic level. *J Bacteriol* **125**, 158-165.

-L-

- Laakel, M., Lebrihi, A., Khaoua, S., Schneider, F., Lefebvre, G. and Germain, P. (1994) Relationship between valine, fatty acids, and spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Can J Microbiol*, **40**, 672-676.
- Labeda, D.P., Testa, R.T., Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H.A. (1984) *Saccharothrix*: a new genus of the *Actinomycetales* related to *Nocardiopsis*. *Int J Syst Bacteriol* **34**, 426-431.
- Labeda, D.P. and Lechevalier, M.P. (1989) Amendment of the genus *Saccharothrix* and descriptions of *Saccharothrix espanaensis* sp. nov., *Saccharothrix cryophilis* sp. nov. and *Saccharothrix mutabilis* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*, **39**, 420-423.
- Labeda, D.P. and Lyons, A.J. (1989) *Saccharothrix texasensis* sp. nov. and *Saccharothrix waywayandensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 355-358.
- Labeda, D.P. and Kroppenstedt, R.M. (2007) Proposal of *Umezawaea* gen. nov., a new genus of the *Actinosynnemataceae* related to *Saccharothrix*, and transfer of *Saccharothrix tangerinus* as *Umezawaea tangerina* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2758-2761.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* **227**, 680-685.
- Lam, K.S., Schroeder, D.R., Veitch, J.M., Colson, K.L., Matson, J.A., Rose, W.C., Doyle, T.W. and Forenza, S. (2001) Production, isolation and structure determination of novel fluoroindolocarbazoles from *Saccharothrix aerocolonigenes* ATCC 39243. *J Antibiot (Tokyo)* **54**, 1-9.
- Lamari, L., Zitouni, A., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Lebrihi, A., Lefebvre, G., Seguin, E. and Tillequin, F. (2002a) New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **55**, 696-701.

- Lamari, L., Zitouni, A., Dob, T., Sabaou, N., Lebihi, A., Germain, P., Seguin, E. and Tillequin, F. (2002b) New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *J Antibiot (Tokyo)* **55**, 702-707.
- Lamari, L. (2006) Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat, E.N.S. de Kouba (Algérie), 177 p.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. and Marinelli, F. (2000) Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, **78**, 399-405.
- Lebrihi, A., Germain, P. and Lefebvre, G. (1987) Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **26**, 130-135.
- Lebrihi, A., Lefebvre, G. and Germain, P. (1988a) Carbon catabolite regulation of cephalosporin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **28**, 44-51.
- Lebrihi, A., Lefebvre, G. and Germain, P. (1988b) A study on the regulation of cephamycin C and expandase biosynthesis by *Streptomyces clavuligerus* in continuous and batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol* **28**, 39-43.
- Lebrihi, A., Lamsaif, D., Lefebvre, G. and Germain, P. (1992) Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**, 382-387.
- Lechevalier, H.A. and Lechevalier, M.P. (1967) Biology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* **21**, 71-100.
- Lee, S.H. and Lee, K.J. (1994) Kinetics of the repression of tylosin biosynthesis by ammonium ion in *Streptomyces fradiae*. *J Biotechnol* **32**, 149-156.
- Li, J., Chen, G. and Webster, J.-M. (1995) Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. *J Nat Prod* **58**, 1081-1086.
- Li, B., Lyle, M.P.A., Chen, G., Li, J., Hu, K., Tang, L., Alaoui-Jamali, M.A. and Webster, J.M. (2007) Substituted 6-amino-4*H*-[1,2]dithiolo[4,3-*b*]pyrrol-5-ones: Synthesis, structure–activity relationships, and cytotoxic activity on selected human cancer cell lines. *Bioorg Med Chem* **15**, 4601-4608.

- Li, L., Qiao B. and Yuan, Y. (2007) Nitrogen sources affect streptolydigin production and related secondary metabolites distribution of *Streptomyces lydicus* AS 4.2501. *Chin J Chem Ectg* **15**, 403-410.
- Lishnevskaja, E.B., Kuzina, Z.A., Asinovskaja, N.K., Belousova, I.I. and Malkov MA. (1986) Cyclic adenosine-3',5'-monophosphate in *Streptomyces antibioticus* and its possible role in regulating oleandomycin biosynthesis and the growth of the culture. *Mikrobiologiya* **55**, 455-460.
- Lounès, A., Lebrihi, A., Benslimane, C., Lefebvre, G. and Germain, P. (1995a) Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomyces ambofaciens*. *Curr Microbiol* **31**, 304-311.
- Lounès, A., Lebrihi, A., Benslimane, C., Lefebvre, G. and Germain P. (1995b) Regulation of valine catabolism by ammonium in *Streptomyces ambofaciens*, producer of spiramycin. *Can J Microbiol*, **41**, 800-808.
- Lounès, A., Lebrihi, A., Benslimane, C., Lefebvre, G. and Germain P. (1996a) Regulation of spiramycin synthesis in *Streptomyces ambofaciens*: Effect of glucose and inorganic phosphate. *Appl Microbiol Biotechnol* **45**, 204-211.
- Lounès, A., Lebrihi, A., Benslimane, C., Lefebvre, G. and Germain, P. (1996b) Effect of nitrogen/carbon ratio on the specific production rate of spiramycin by *Streptomyces ambofaciens*. *Process Biochem*, **31**, 13-20.
- Lübke, C., Wolfe, S. and Demain, A.L. (1985) Repression and inhibition of cephalosporin synthetases in *Streptomyces clavuligerus* by inorganic phosphate. *Arch Microbiol* **140**, 317-320.

-M-

- Maisin, A. (2006) Classification, emballage et étiquetage des substances et préparations chimiques dangereuses. ED 983. 1^{er} ed. Paris : Institut National de Recherche et de Sécurité 48 pp.
- Malapaka, V.R.R., Barrese, A.A. and Tripp, B.C. (2007) High-throughput screening for antimicrobial compounds using a 96-well format bacterial motility absorbance assay. *J Biomol Screen* **12**, 849-854.
- Martin, J.F. and Mc Daniell, L.E. (1976) Biosynthesis of candicidin by phosphate-limited resting cells of *Streptomyces griseus*. *European J Appl Microbiol* **3**, 135-144.

- Martín, J.F. (1977) Control of antibiotic synthesis by phosphate. *Adv Biochem Eng* **6**, 105-127.
- Martín, J.F. and Demain, A.L. (1980) Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol Rev* **44**, 230-251.
- Martinkova, L. and Milerova, V. (2003) Synthetic applications of nitrile-converting enzymes. *Curr Org Chem* **7**, 1279-1295.
- Martinkova, L., Uhnakova, B., Patek, M., Nesvera, J. and Kren, V. (2009) Biodegradation potential of the genus *Rodococcus*. *Environ Int* **35**, 162-177.
- Marvil, D.K. and Leisinger, T. (1977) IV-Acetylglutamate synthase of *Escherichia coli*: Purification, Characterization and molecular properties. *J Biol Chem* **252**, 3295-3303.
- Masuma, R., Tanaka, Y., Tanaka, H. and Omura, S. (1986) Production of nanaomycin and other antibiotics by phosphate-depressed fermentation using phosphate-trapping agents. *J Antibiot (Tokyo)* **39**, 1557-1564.
- Mc Dermott, J.F., Lethbridge, G. and Bushell, M.E. (1993) Estimation of the kinetic constants and elucidation of trends in growth and erythromycin production in batch and continuous cultures of *Saccharopolyspora erythraea* using curve-fitting techniques. *Enzyme Microb Technol* **15**, 657-663.
- Mc Dowall, K., Thamchaipenet, A. and Hunter, I.S. (1999) Phosphate control of oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* is at the level of transcription from promoters overlapped by tandem repeats similar to those of the DNA-binding sites of the OmpR family. *J Bacteriol* **181**, 3025-3032.
- Mc Inerney, B. V., Gregson, R. P., Lacey, M. J., Akhurst, R. J., Lyons, G. R., Rhods, S.H., Smith, D. R. J., Engelhardt, L. M. and White, A. H. (1991) Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. Part 1. Dithiolopyrrolone derivatives with antibiotics activity. *J Nat Prod* **54**, 774-784.
- Mc Intyre, J.J., Bull, A.T. and Bunch A.W. (1996) Vancomycin production in batch and continuous culture. *Biotechnol Bioeng* **49**, 412-420.
- Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 11th edition. Whitehouse Station (NJ): Merck & Co., Inc. (1989).
- Mertz, F.P. and Doolin, L.E. (1973) The effect of inorganic phosphate on the biosynthesis of vancomycin. *Can J Microbiol* **19**, 263-270.

- Minamigushi, K., Kumagai, H., Masuda, T., Kawada, M., Ishizuka, M. and Takeushi, T. (2001) Thiolutin, an inhibitor of huvec adhesion to vitronectin, reduces paxillin in huvecs and suppresses tumor cell-induced angiogenesis. *Int J Cancer* **93**, 307-316.
- Moreira, K.A., Albuquerque, B.F., Teixeira, M.F.S., Porto, A.L.F. and Lima, J.L. (2002) Application of protease from *Nocardiopsis* sp. as a laundry detergent additive. *World J Microbiol Biotechnol* **18**, 307-312.
- Moskowitz, G.J. and Merrick, J.M. (1969) Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate. II. Enzymatic synthesis of D-(-)-beta hydroxybutyryl coenzyme A by an enoyl hydratase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry* **8**, 2748-2755.

-N-

- Nandi, D., Lucas, S.V. and Webster, L.T. (1979) Benzoyl-coenzyme A: glycine N-acetyltransferase and phenylacetyl-coenzyme A: glycine N-acyltransferase from bovine liver mitochondria: purification and characterization. *J Biol Chem* **254**, 7230-7237.
- Nesterenko, O.A., Kasumova, S.A. and Kvasnikov, E.I. (1978) Microorganisms of the genus *Nocardia* and the “rhodochrous” group in the soil of the Ukrainian SSR. *Mikrobiologiya* **47**, 866-870.
- Neuwald, A.F. and Landsman, D. (1997) GCN5-related histone N-acetyltransferase belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10. *Trends Biochem Sci* **22**, 154.
- Nguyen, K.T., Nguyen, L.T. and Běhal, V. (1995a) The induction of valine deshydrogenase activity from *Streptomyces* by L-valine is not repressed by ammonium. *Biotechnol Lett* **17**, 31-34.
- Nguyen, K.T., Nguyen, L.T. and Běhal, V. (1995b) The avermectin-producing *Streptomyces avermitilis* possesses an inducible valine deshydrogenase. *Biotechnol Lett* **17**, 151-156.
- Niemi, J. (1995) Hybrid anthracycline antibiotics: Analysis and application of rhodomycine biosynthetic genes from *Streptomyces purpuracens*. PH.D. Thesis, Univ. Turku (Finland).
- Niladevi, K.N. and Prema, P. (2005) Mangrove actinomycetes as the source of ligninolytic enzymes. *Nippon Hosenkin Gakkaishi* **19**, 40-47.

- Nimi, O., Kubota, H. and Sugiyama, M. (1981) Effect of arginine on gramicidin S biosynthesis by *Bacillus brevis*. *J antibiot (Tokyo)* **35**, 615-621.
- Ninomiya, Y.T., Yamada, Y., Shirai, H., Onitsuka, M., Suhara, Y. and Maruyama, H.B. (1980) Biochemically active substances from microorganisms. V. Pyrrothines, potent platelet aggregation inhibitors of microbial origin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **28**, 3157-3162.

-O-

- Obanye, A.I.C., Hobbs, G., Gardner, D.C.J. and Oliver, S.G. (1996) Correlation between carbon flux through the pentose pathway and production of the antibiotic methylenomycin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **142**, 133-137.
- Obregon, A.M., Escalante, L., Gonzalez, R. Rodriguez, R. and Sanchez, S. (1994) Physiological studies on gentamycin: phosphate repression of antibiotic formation. *J Antibiot (Tokyo)* **12**, 1442-1446.
- Ochi, K. (1986) Occurrence of the stringent response in *Streptomyces* sp. And its significance for the initiation of morphological and physiological differentiation. *J Gen Microbiol* **132**, 2621-2631.
- Ochi, K. (1990) A relaxed (*re0* mutant of *Streptomyces coelicolor* A3(2) with a missing ribosomal protein lacks the ability to accumulate ppGpp, A-factor and prodigiosin. *J Gen Microbiol* **136**, 2405-2412.
- Oestergaard, P.R. and Sjoeholm, C. Use of acid-stable proteases in animal feed. Patent WO2001058276. 16th August 2001.
- Okamura, K., Soga, K., Shimauchi, Y., Ishikura, T. and Lein, J. (1977) Holomycin and N-propionyl-holothin, antibiotics produced by a cephamycin C producer. *J Antibiot (Tokyo)* **30**, 334-336.
- Oliva, B., O'Neill, A., Wilson, J.M, O'Hanlon, P.J. and Chopra I. (2001) Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin. *Antimicrob Agents and Chemother* **45**, 532-539.
- Omura, S., Tanaka, Y., Tanaka, H., Takahashi, Y. and Iwai, Y. (1980) Stimulation of the production of macrolide antibiotics by magnesium phosphate and related insoluble materials. *J Antibiot (Tokyo)*, **33**, 1568-1569.

- Omura, S., Tanaka, Y., Hamada, H. and Masuma, R. (1984) Effect of ammonium ion, inorganic phosphate and amino acids of the biosynthesis of protylonolide, a precursor of tylosin aglycone. *J Antibiot* **37**, 494-502.
- Orstein, L. (1964) Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann NY Acad Sc* **121**, 321.
- Ortmann, R., Matern, U. and Grisebach, H. (1974) NADPH-dependent formation of thymidine diphosphodihydrostreptose from thymidine diphospho-D-glucose in a cell-free system from *Streptomyces griseus* and its correlation with streptomycin biosynthesis. *Eur J Biochem* **43**, 265-271.
- Otaguro, K., Oiwa, R., Iwai, Y., Tanaka, H. and Omura, S. (1988) Screening for new antitrichomonal substances of microbial origin and antitrichomonal activity of thrichostatin A. *J Antibiot (Tokyo)* **41**, 461-468.

-P-

- Paik, S., Park, Y.H., Suh, S.II. Kim, H.S., Lee, I.S. Park, M.K. Lee, C.S. and Park, S.H. (2001) Unusual cytotoxic phenethylamides from *Xenorhabdus nematophilus*. *Bull Korean Chem Soc* **22**, 372-374.
- Pamboukian, C.R.D. and Facciotti, M.C.R. (2004) Production of the antitumoral retamycin during continuous fermentations of *Streptomyces olindensis*. *Process Biochem* **39**, 2249-2255.
- Park, Y. S., Momose, I., Tsunoda, K. and Okabe, M. (1994) Enhancement of cephamycin C production using soybean oil as the sole carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol* **40**, 773-779.
- Park, S.W., Han, S.J., Kim, D.-S. and Sim, S.J.(2007) Improvement of epothilone B production by *in situ* removal of ammonium using cation exchange resin in *Sorangium cellulosum* culture. *Biochem Eng J* **37**, 328-331.
- Parker, A.J. and Karasch, N. (1959) The scission of the sulfur-sulfur bond. *Chem Rev* **59**, 583-628.
- Patke, D. and Dey, S. (1998) Proteolytic activity from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SDP4. *Lett Appl Microbiol* **26**, 171-174.
- Pelechano, V. and Perez-Ortin, E. (2008) The transcriptional inhibitor thiolutin blocks mRNA degradation in yeast. *Yeast* **25**, 85-92.

- Perez, F., Salata, R. and Bonomo, R.A. (2008) Current and novel antibiotics against resistant Gram-positive bacteria. *Infection and drug resistance* **1**, 27-44.
- Perlman, D. and Sebek, O.K. (1971) Microbial transformations of antibiotics. *Pure Appl Chem* **28**, 637-648.
- Perlman, D. and Wagman, G.H. (1952) Studies on the utilization of lipids by *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* **63**, 253-262.
- Peric-Concha, N. and Long, P.F. (2003) Mining the microbial metabolome: a new frontier for natural product lead discovery. *Drug Discov Today* **8**, 1078-1084.
- Pfam, Pfam protein families database 26.0 [en ligne], disponible sur <http://pfam.sanger.ac.uk/> (consulté le 5/08/09).
- Pfizer and co. Desacetylthiolutin, amides and salts thereof. Patent GB 753331. 25th July 1956.
- Pourreza A., Witherspoon M., Fox, J., Newmark, J., Bui, D. and Tomalsky, M.E. (2005) Mutagenesis analysis of a conserved region involved in acetyl coenzyme A binding in aminoglycoside 6' N-acetyltransferase type Ib encoded by plasmid pJHCMW1. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2979-2982.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., Bacq-Calberg, C.-M. et Dusart, J. Microbiologie. 2^{ème} édition. Bruxelles : De Boeck Université, 2003, 1164 p.
- Prokofieva-Belgovskaya, A. and Popova, L. (1959) The influence of phosphorus on the development of *Streptomyces aureofaciens* and on its ability to produce chlortetracycline. *J Gen Microbiol* **20**, 462-472.

-R-

- Radika, K. and Northrop, D.B. (1984) Correlation of antibiotic resistance with Vmax/Km ratio of enzymatic modification of aminoglycosides by kanamycin acetyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother* **25**, 479-482.
- Rius, N., Maeda, K., Demain, A.L. (1996) Induction of L-lysine ϵ -aminotransferase by L-lysine in *Streptomyces clavuligerus*, producer of cephalosporins. *FEMS Microbiol Lett* **144**, 207-211.
- Rokem, J.S., Eliasson Lantz, A. and Nielsen J. (2007) Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Nat Prod Rep* **24**, 1262-1287.

- Ruch, F.E. and Vagelos, P.R. (1973) Malonyl coenzyme A-acyl carrier protein transacylase. *J Biol Chem* **23**, 8086-8094.

-S-

- Sabaou, N., Boudjella, H., Bennadji, A., Mostefaoui, A., Zitouni, A., Lamari, L. et Bennaji, H. (1998) Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse* **9**, 147-153.
- Sankaran, L. and Pogell, B. M. (1975) Biosynthesis of puromycin in *Streptomyces alboniger*: regulation and properties of O-demethylpuromycin O-methyltransferase. *Antimicrob Agents and Chemother* **8**, 721-732.
- Santoro, N., Brtva, T., Roest, S.V., Siegel, K. and Waldrop, G.L. (2006) A high-throughput screening assay for the carboxyltransferase subunit of acetyl-CoA carboxylase. *Anal Biochem* **354**, 70-77.
- Satoh, A., Ogawa, H. and Satomura, Y. (1976) Regulation of N-acetylkanamycin amidohydrolase in the idiophase in kanamycin fermentation. *Agr Biol Chem* **40**, 191-196.
- Scarbrough, E., Williams, J.W. and Northrop, D.B. (1979) Spectrophotometric assay for amikacin using purified kanamycin acetyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother* **16**, 221-224.
- Schmidt, U. and Geiger, F. (1962) Total synthesis of the antibiotics thiolutin, aureothricin and holomycin. *Angew Chem* **74**, 328.
- Seneca, H., Kane, J. H. and Rockenbach, J. (1952) Bacterial, protozoal and fungicidal properties of thiolutin. *Antibiot Chemother* **2**, 375-360.
- Senthilkumar, S., Sivakumar, K. and Kannan, L. (2005) Mercury resistant halophilic actinomycetes from the salt marsh environment of vellar estuary, southeast coast of India. *J Aqua Biol* **20**, 141-145.
- Shapiro, S. and Vining, L.C. (1985) Effect of ammonium on chloramphenicol production by *Streptomyces venezuelae* in batch and continuous culture. *Can J Microbiol* **31**, 119-123.
- Sharma, R., Sharma, C.L., Kapoor, B. (2005) Antibacterial resistance: current problems and possible solutions. *Indian J Med Sci* **59**, 120-129.

- Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S. and Miller, G.H. (1993) Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* **57**, 138-163.
- Shiozawa, H., Kagasaki, T., Kinoshita, T., Haruyama, H., Domon, H., Utsui, Y., Kodama, K. and Takahashi, S. (1993) Thiomarinol, a new hybrid antimicrobial antibiotic produced by a marine bacterium. Fermentation, isolation, structure, and antimicrobial activity. *J Antibiot (Tokyo)* **46**, 1834-1842.
- Shiozawa, H., Kagasaki, T., Torikata, A., Tanaka, N., Fujimoto, K., Hata, T., Furukawa, Y. et Takahashi, S. (1995) Thiomarinols B and C, new antimicrobial antibiotics produced by a marine bacterium. *J Antibiot (Tokyo)* **48**, 907-909.
- Shiozawa, H., Shimada, A. and Takahashi, S. (1997) Thiomarinols D, E, F and G, new hybrid antimicrobial antibiotics produced by a marine bacterium; isolation, structure, and antimicrobial activity. *J Antibiot (Tokyo)* **50**, 449-452.
- Shirling, E.B. and Gottlieb, D. (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 313-340.
- Sikyta, B., Slezak, J. and Herold, M. (1961) Growth of *Streptomyces aureofaciens* in continuous culture. *Appl Microbiol* **9**, 233-238.
- Sivasubramanian, N. and Jayaraman, R. (1976) Thiolutin resistant mutants of *Escherichia coli* are they chain initiation mutants. *Mol Gen Genet* **145**, 89-96.
- Sribney, M. (1966) Enzymatic synthesis of ceramide. *Biochim Biophys Acta* **125**, 542-547.
- Stachel, H.-D., Immerz-Winkler, E., Poschenrieder, H., Windt, A., Weigand, W., Drescher, N. and Wünsch, R. (2003) Metal complexes of functionalized sulfur-containing ligands. Part XIX Synthesis and reactions of new Pyrroloisothiazoles. *Helv Chim Acta* **86**, 2471-2480.
- Stahl, P., Seidel, H., Von der Eltz, H., Wilhelms, O.-H. and Roesch, A. Pyrrothine derivatives and pharmaceutical use thereof. Patent US4760077. 26th July 1988.
- Sternglanz, R. and Schindelinz, H. (1999) Structure and mechanism of action of the histone acetyltransferase Gcn5 and similarity to other N-acetyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8807-8808.
- Stöveken, T., Kalscheuer, R., Malkus, U., Reichelt, R. and Steinbüchel, A. (2005) The wax ester synthase/acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase from

Acinetobacter sp. Strain ADP1: characterization of a novel type of acyltransferase. *J Bacteriol* **187**, 1369-1376.

- Strub, C. (2008) Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat, Université de Toulouse, INP-ENSAT (France), 174 p.
- Svensson, M.-L., Prodyut, R. and Gatenbeck, S. (1983) Glycerol catabolite regulation of D-cycloserine production in *Streptomyces garyphalus*. *Arch Microbiol* **135**, 191-193.

-T-

- Takahashi, Y., Matsumoto, A., Seino, A., Iwai, I. and Omura, S. (1996) Rare actinomycetes isolated from desert soils. *Actinomycetol* **10**, 91-97.
- Takahashi, Y. and Omura, S. (2003) Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J Gen Appl Microbiol* **49**, 141-154.
- Takano, E. (2006) γ -butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Curr Opin Microbiol* **9**, 287-294.
- Takano, E. and Bibb, M.J. (1994) The stringent response, ppGpp and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Actinomycetol* **8**, 1-16.
- Tanaka, Y., Taki, A., Masuma, R. and Omura, S. (1986) Mechanism of nitrogen regulation of protylonolide biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *J Antibiot* **39**, 813-821.
- Tang, S.K., Wang, Y., Cai, M., Zhi, X.Y., Lou, K., Xu, L.H., Jiang, C.L. and Li, W.J. (2009) *Saccharopolyspora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a saline lake in China. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 555-558.
- Tanner, F. W., Means, J. A. and Davisson, J. W. (1950) Thiolutin, an antibiotic produced by certain strains of *Streptomyces albus*. *118th Meeting, American Chemical Society*. 7-8 September, 1950.
- Tanner, K. G., Langer, M.R. and Denu, J.M. (2000) Kinetic mechanism of human Acetyltransferase P/CAF. *Biochemistry* **39**, 11961-11969.
- Tipper, D.J. (1973) Inhibition of yeast ribonucleic acid polymerases by thiolutin. *J Bacteriol* **116**, 245-256.

- Tobin, M.B., Fleming, M.D., Skatrud, P.L. and Miller, J.R. (1990) Molecular characterization of the acyl-coenzyme A:isopenicillin N acyltransferase gene (penDE) from *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans* and activity of recombinant enzyme in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**, 5908-5914.
- Trievel, R.C., Rojas, J.R., Sterner, D.E., Venkataramani, R.N., Wang, L., Zhou, J., Allis, C.D., Berger, S.L. and Marmorstein, R. (1999) Crystal structure and mechanism of histone acetylation of the yeast GCN5 transcriptional coactivator. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 8931-8936.
- Trilli, A., Crossley, M.V. and Kontakou, M. (1987) Relation between growth rate and erythromycin production in *Streptomyces erythraeus*. *Biotechnol Lett* **9**, 765-770.

-U-

- Untrau, S., Lebrihi, A., Lefebvre, G. and Germain, P. (1994) Nitrogen catabolite regulation of spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. *Curr Microbiol* **28**, 111-118.
- Untrau-Taghian, S., Lebrihi, A., Germain, P. and Lefebvre G. (1995) Influence of growth rate and precursor availability on spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. *Can J Microbiol* **41**, 157-162.

-V-

- Van der Westhuizen, F.H., Pretorius, P.J. and Erasmus, E. (2000) The utilization of alanine, glutamic acid, and serine as amino acid substrate for glycine N-acyltransferase. *J biochem Mol Toxicol* **14**, 102-109.
- Vetting, M.W., S. de Carvalho, L.P., Yu, M., Hegde, S.S., Magnet, S., Roderick, S.L. and Blanchard, J.S. (2005) Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch Biochem Biophys* **433**, 212-226.
- Voelker, F. and Altaba, S. (2001) Nitrogen source governs the patterns of growth and pristnamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiology* **147**, 2447-2459.

- Von Daehne, W., Godtfredsen, W. O. and Tybring, L. and Schaumburg, K. (1969) New antibiotics containing the 1,2-dithiolo[4,3-b]pyrrole ring system. *J Antibiot (Tokyo)* **22**, 233-236.
- Vonothini, G., Murigan, M., Sivakumar, K. and Sudha, S. (2008) Optimization of protease production by an actinomycete strain, PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond. *Afr J Biotechnol* **7**, 3225-3230.
- Vu-Trong, K., Bhuwapathanapun, S. and Gray, P.P. (1980) Metabolic regulation in tylosin-producing *Streptomyces fradiae* : regulatory role of adenylate nucleotide pool and enzymes involved in biosynthesis of tylosin precursors. *Antimicrob Agents and Chemother* **17**, 519-525.
- Vu-Trong, K., Bhuwapathanapun, S. and Gray, P.P. (1981) Metabolic regulation on tylosin-producing *Streptomyces fradiae* : phosphate control of tylosin biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother* **19**, 209-212.
- Vu-Trong, K. and Gray, P.P. (1982) Continuous-culture studies on the regulation of tylosin biosynthesis. *Biotechnol Bioeng* **24**, 1093-1103.

-W-

- Walker, M.S. and Walker, J.B. (1971) Streptomycin biosynthesis. Separation and substrate specificities of phosphatases acting on guanidino-deoxy-scylo-inositol phosphate and streptomycin-(streptidino)phosphate. *J Biol Chem* **246**, 7034-7040.
- Walker, K., Long, R. and Croteau, R. (2002) The final acylation step in taxol biosynthesis: cloning of the taxoid C13-side-chain N-benzoyltransferase from *Taxus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 9166-9671.
- Wallace, K.K., Payne, G.F. and Speedie, M.K. (1990) Ammonium effects of streptonigrin biosynthesis by *Streptomyces flocculus*. *J Ind Microbiol* **6**, 43-48.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murry, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P. and Trüper H.G. (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 463-464.
- Webster, J.M., Li, J. and Chen, G. Anticancer properties of dithiopyrrolones. Patent US6020360. 1st February 2000.

- Wegman, M.A., Janssen, M.H.A., Van Rantwijk, F. and Sheldon, R.A. (2001) Towards biocatalytic synthesis of β -lactam antibiotics. *Adv Synth Catal* **343**, 559-576.
- Wehrli, W. and Staehelin, M. (1971) Actions of the rifamycins. *Bacteriol rev* **35**, 290-309.
- Williams, J.F. and Northrop, D.B. (1978) Kinetic mechanisms of gentamycin acetyltransferase I. *J Biol Chem* **53**, 5902-5907.
- Willoughby, L.G. (2006) Observations on some aquatic actinomycetes of streams and river. *Freshw Biol* **1**, 23-27.
- Wybenga-Groot, L.E., Draker, K., Wright, G.D. and Berghuis, A.M. (1999) Crystal structure of an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase: defining the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily fold. *Structure* **7**, 497-507.

-Y-

- Yajima, T., Mason, K.T. and Katz, E. (1975) Branched-Chain amino acid substitutions in the biosynthesis of the antibiotic actinomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **7**, 773-780.
- Yamagishi, S., Koyama, Y., Fukakusa, Y., Kyomura, N., Ohishi, J.-I. Hamamichi, N. and Arai, T. (1971) On the metabolites of *Streptomyces luteoreticuliti* Katoh et Arai. I. Isolation of the metabolites. *Yakugaku Zasshi* **91**, 351-357.
- Yoshioka, S. and Stella, V.J. (2001) Stability of drugs and dosage forms. Paris: Springer, 268 pp.

-Z-

- Zaidenzaig, Y., Fitton, J.E., Packman, L.C. and Shaw, W.V. (1979) Characterization and comparison of chloramphenicol acetyltransferase variants. *Eur J Biochem* **100**, 609-618.
- Zhang, Y.-X., Denoya, C.D., Skinner, D.D., Fedechko R.W., Mc Arthur, H.A.I., Morgenstern, M.R., Davies, R.A., Lobo, S., Reynolds, K.A. and Hutchinson, R. (2009) Genes encoding acyl-CoA dehydrogenase (AcdH) homologues from *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces avermitilis* provide insights into the

metabolism of small branched-chain fatty acids and macrolide antibiotic production. *Microbiology* **145**, 2323-2334.

- Zhang, L. Integrated approaches for discovering novel drugs from microbial natural products. **In:** Natural products, drug discovery and therapeutic medicine. Humana press. Totawa, New Jersey: Zhang, L. and Demain, A.L., 2005, 382 p.
- Zimmermann, W., Winter, B. and Broda, P. (1988) Xylanolytic enzyme activities produced by mesophilic and thermophilic actinomycetes grown on graminaceous xylan and lignocelluloses. *FEMS Microbiol Lett* **55**, 181-185.
- Zitouni, A., Lamari, L., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Gaouar, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Labeda, D.P. (2004) *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1377-1381.
- Zygmunt, W.A. (1964) Influence of inorganic phosphorus on oxytetracycline formation by *Streptomyces rimosus*. *Appl Microbiol* **12**, 195-196.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Appareillage, produits et consommables

Liste de l'appareillage utilisé

- Agitateur rotatif New Brunswick Scientific (Edison, New Jersey, USA) classic series C1
- Armoire Liebherr (Bulle, Suisse) LKPv 6522
- Bain-marie Lauda (Lauda-Königshofen, Allemagne) A100
- Balance Ohaus (Pine Brook, New Jersey, USA) Scout Pro
- Balance de précision Sartorius analytic (Bradford, Massachusetts, USA) A200S-F1 classe I
- Centrifugeuse ThermoFisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) Sigma 4K15
- Congélateur -32 °C Liebherr Comfort
- Congélateur -86 °C ThermoFisher Scientific Forma – 86C ULT freezer
- Disrupteur ThermoFisher Scientific Fast Protein 120
- Eau ultrapure Elga groupe Véolia water (Antony, France) Purelab Maxima
- Etuve Heraeus Instrument (Hanau, Germany) Function line B12
- Four Memmert (Schwabach, Allemagne) V40
- Générateur Biorad (Hercules, Californie, USA) Power Pac 300
- Incubateur Liebherr Aqua lytic
- Microcentrifugeuse Heraeus Instrument Biofuge Pico
- Microcentrifugeuse réfrigérée ThermoFisher Scientific Sigma 1K15
- pH-mètre Consort (Turnhout, Belgique) C832 Multi-Channel analyzer
- Rotavapor Heidolph (Kelheim, Germany) Laborota 4000
- Spectromètre Bruker (Billerica, MA, USA) DPX 300
- Spectrophotomètre Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, USA) UV/Vis Spectrometer Lambda 20
- Speed-vac composé d'un groupe réfrigérant Huber (Offenburg, Germany) Minichiller, (référence 4660010), d'une pompe Ilmvac (Ilmenau, France) LVS 210 Tp Ecoflex, d'une cuve de concentration et son système de contrôle Genevac (Ipswich, England) Mivac Duo Concentration

- Système d'électrophorèse de protéines Biorad Mini-PROTEAN Tetra Cell pour la réalisation de mini gels 10 puits d'1 mm d'épaisseur, référence 1658001
- Table agitante Edmund Bühler (Hechingen, Allemagne) SM30 Control
- Vortex ThermoFisher Scientific Top mix, référence FB15024

Liste du consommable utilisé

- Boudins de dialyse Spectrum laboratories (Rancho Dominguez, California, USA) Spectra/Por Biotech cellulose ester MWCO 15000, référence 131303
- Colonne d'échange d'anions Biorad Bioscale Mini UNOsphere Q, référence 732-4102
- Colonne d'interactions hydrophobes GE healthcare (Chalfont St. Giles, Royaume-Uni) Colonne HiTrap HIC, Phenyl Sepharos 6 Fast Flow (high sub), référence 17-1355-01
- Colonne de filtration de gel Biorad Econopac 10DG, référence 732-2010
- Filtre membrane nylon ϕ 47 mm seuil 0,2 μ m Whatmann (Maidstone, Royaume-Uni), référence 7404-004
- Filtre membrane en esters de cellulose ϕ 47 mm seuil 0,2 μ m Advantec (Dublin, California, USA), référence A020G047A
- Filtre seringue en acétate de cellulose ϕ 30 mm seuil 0,2 μ m ThermoFisher Scientific, référence 5174E
- Plaques de chromatographie sur couche mince Merck (Darmstadt, Allemagne), référence 1.05554.0001
- Tubes pour disrupteur Fast Prep MP biomedicals (Irvine, California, USA) Tubes Fast Protein Blue 6911-050
- Tubes d'ultrafiltration Sartorius stedim biotech (Goettingen, Allemagne) Vivaspin 2 MWCO 10000 VS02H01

Liste des produits chimiques utilisés

- Acétate d'ammonium Acros organics (Geel, Belgique), groupe ThermoFisher scientific, référence 169880025
- Acétonitrile grade HPLC ThermoFisher scientific, référence A/0626/17
- Acide acétique Acros organics, 222140025
- Acide benzoïque Acros organics, référence 221802500

- Acide humique Fluka, groupe Sigma Aldrich (St Louis, Missouri, USA), référence 53680
- Acide hydrochlorique ThermoFisher scientific, référence H/1200/PB15
- Acide laurique Sigma Aldrich, référence L556
- Acide palmitique Sigma Aldrich, référence P0625
- Acide phénylacétique Fluka, référence 78490
- Acide trichloroacétique ThermoFisher scientific, référence T/3000/50
- Acrylamide 30%/Bis ratio 37,5 :1 Biorad, référence 161-0158
- Agar ThermoFisher Scientific, référence 2801W
- Albumine de sérum bovin Sigma Aldrich, référence A2153
- Bleu de Bromophénol Biorad, référence 161-0404
- Butanol ThermoFisher scientific, référence B/4850/15
- Carbonate de calcium Merck, référence 1.02066.1000
- Chlorure de sodium Sigma Aldrich, référence S6191
- Chlorure de titanium Acros organics, référence 197232500
- Chlorure d'oxalyle Acros organics, référence 129611000
- Cocktail anti-protéase Sigma Aldrich, référence P8215
- D(+) glucose Acros Organics, référence 170080025
- 1,3-dichloroacétone Acros organics, référence 173630500
- Dichlorométhane ThermoFisher scientific D/1850/17
- 1,4-dioxane VWR Prolabo (West Chester, Pennsylvanie, USA), référence 23539.291
- Extrait de levure BD diagnostics (Sparks, Maryland, USA), référence 212750
- Extrait de malt BD diagnostics, référence 218630
- Glycérol ThermoFisher scientific, référence G/0650/17
- Glycine Biorad, référence 161-0717
- Hydroxyde de sodium Sigma Aldrich, référence S8045
- Kit de coloration au nitrate d'argent Pierce, groupe ThermoFisher scientific, référence 24597
- *m*-crésol (ou 3-méthylphénol) Acros organics, référence 110585000
- 2-Mercaptoéthanol Biorad, référence 161-0710
- Méthanol grade HPLC ThermoFisher scientific, référence M/4056/17
- 4-méthoxybenzylamine Acros organics, référence 125780250
- Méthoxyde de sodium Acros organics, référence 173125000

- Ninhydrine
- *p*-methoxybenzylthiol (ou 4-methoxy- α -toluenethiol) Acros organics, référence 150950250
- Persulfate d'ammonium Biorad, référence 161-0700
- Phosphate de potassium dibasique Acros organics, référence 215470010
- Phosphate de potassium monobasique Acros organics, référence 205925000
- Réactif de Bradford Sigma Aldrich, référence B6916
- Silice GF 254 Fluka, référence 60765
- Sodium Dodécyl Sulfate Biorad, référence 161-0301
- Solution de coloration à base de coomassie colloïdal G-250 Fermentas (Burlington, Ontario, Canada) Page Blue Protein Staining solution, référence R0571
- Solution de staining à base de coomassie R-250 Biorad, référence 161-0436
- Standards de protéines Biorad, standards broad range référence 161-0317
- Sulfate d'ammonium VWR Prolabo, référence 21332.293
- Sulfate de magnésium heptahydraté Acros organics, référence 213115000
- Sulfate de sodium Acros organics, référence 196640025
- TEMED Biorad, référence 161-0800
- Triéthyle amine Acros organics, référence 157911000
- Tris-HCl MP Biomedicals, référence 194855
- Tween 80 ThermoFisher scientific, référence Fisher labosi A4920901

Liste des acyls-CoA utilisés

- Acétyl coenzyme A Sigma Aldrich, référence A2181
- Acétoacétyl coenzyme A Sigma Aldrich, référence A1625
- Benzoyl coenzyme A Sigma Aldrich, référence B1638
- Butyryl coenzyme A Sigma Aldrich, référence B1508
- Crotonoyl coenzyme A Sigma Aldrich, référence 28007
- Hexanoyl coenzyme A Sigma Aldrich, référence H2012
- β -hydroxybutyryl coenzyme A Sigma Aldrich, référence H0261
- Lauroyl coenzyme A Sigma Aldrich référence L2659
- Palmitoyl coenzyme A Sigma Aldrich référence P9716
- Phénylacétyl coenzyme A Sigma Aldrich référence P2153

ANNEXE 2 : Synthèse du standard de thiolutine

Protocole d'obtention

La production microbiologique de la thiolutine et son extraction du milieu de culture sont réalisées comme indiqué en chapitre II., paragraphe 4.1 et 4.2 respectivement. La thiolutine est ensuite purifiée par recristallisation dans l'acétate d'éthyle. 190 mg d'extrait sont solubilisés à reflux dans 6,1 mL d'acétate d'éthyle. Le milieu réactionnel est refroidi 3 h 30 à température ambiante puis 72 h à 4 °C. Le milieu est filtré sous pression réduite. Les cristaux (N°1) obtenus sur le filtre sont lavés à l'éther diéthylique. Le filtrat est ensuite concentré sous vide. Il est filtré puis placé à -24 °C. Après 24 h, il est de nouveau filtré. Les cristaux (N°2) obtenus sur le filtre sont lavés à l'éther diéthylique. Toutes les filtrations sont réalisés sur des filtres nylon (seuil 0,2 µm). L'éther diéthylique est préalablement refroidi à -24 °C. Les cristaux N°1 et N°2 sont rassemblés (m = 9 mg), ils constituent le standard de thiolutine.

Analyse LC, LC-MS et spectre UV

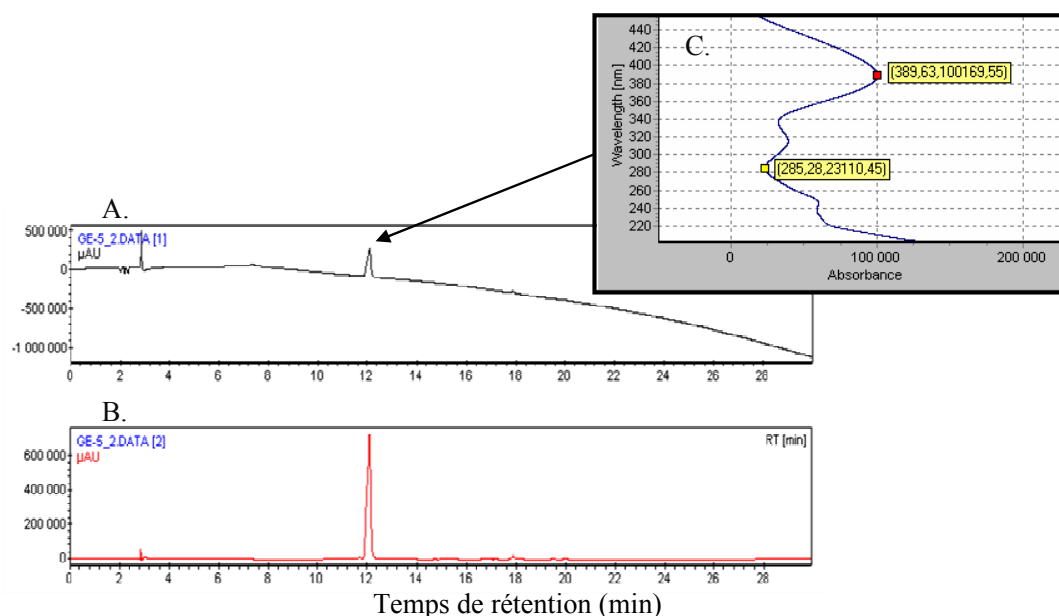


Figure Annexe 2 - 1 Analyse HPLC du standard de thiolutine à 60 mg L⁻¹ suivant la méthode « DTPs extracellulaire ». A. Détection à 220 nm. B. Détection à 390 nm. C. Spectre UV du pic à 12,1 min.

Une solution de thiolutine (obtenue selon le protocole en 0) à 60 mg L^{-1} est réalisée dans un mélange H_2O ultrapure/ CH_3CN (grade HPLC). Elle est analysée suivant la méthode DTPs extracellulaires. Le résultat est présenté sur la Figure Annexe 2 - 1. Le spectre UV du pic majoritaire obtenu ($\text{Tr} = 12,1 \text{ min}$) correspond au spectre UV de la thiolutine décrit dans la littérature (Celmer and Solomons 1955).

Par ailleurs le spectre de masse du pic élué à 12,1 min (Figure Annexe 2 – 2) indique un pic de base à m/z 229,0 dont la masse correspond à l'ion moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ de la thiolutine ($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z calculée 228,9) et l'ion fils caractéristique des dérivés pyrrothine, m/z 187, correspondant à la forme protonée de la pyrrothine.

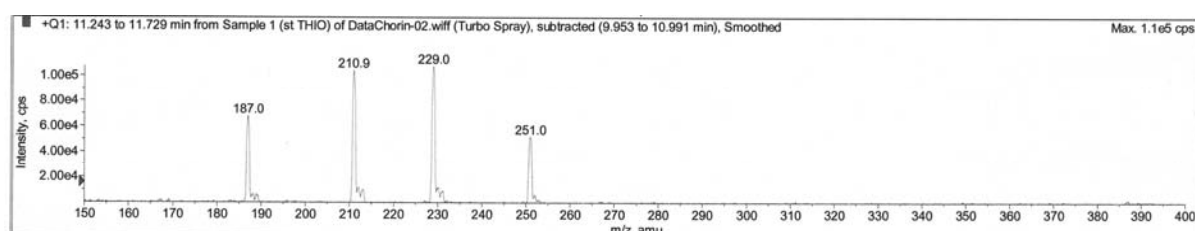
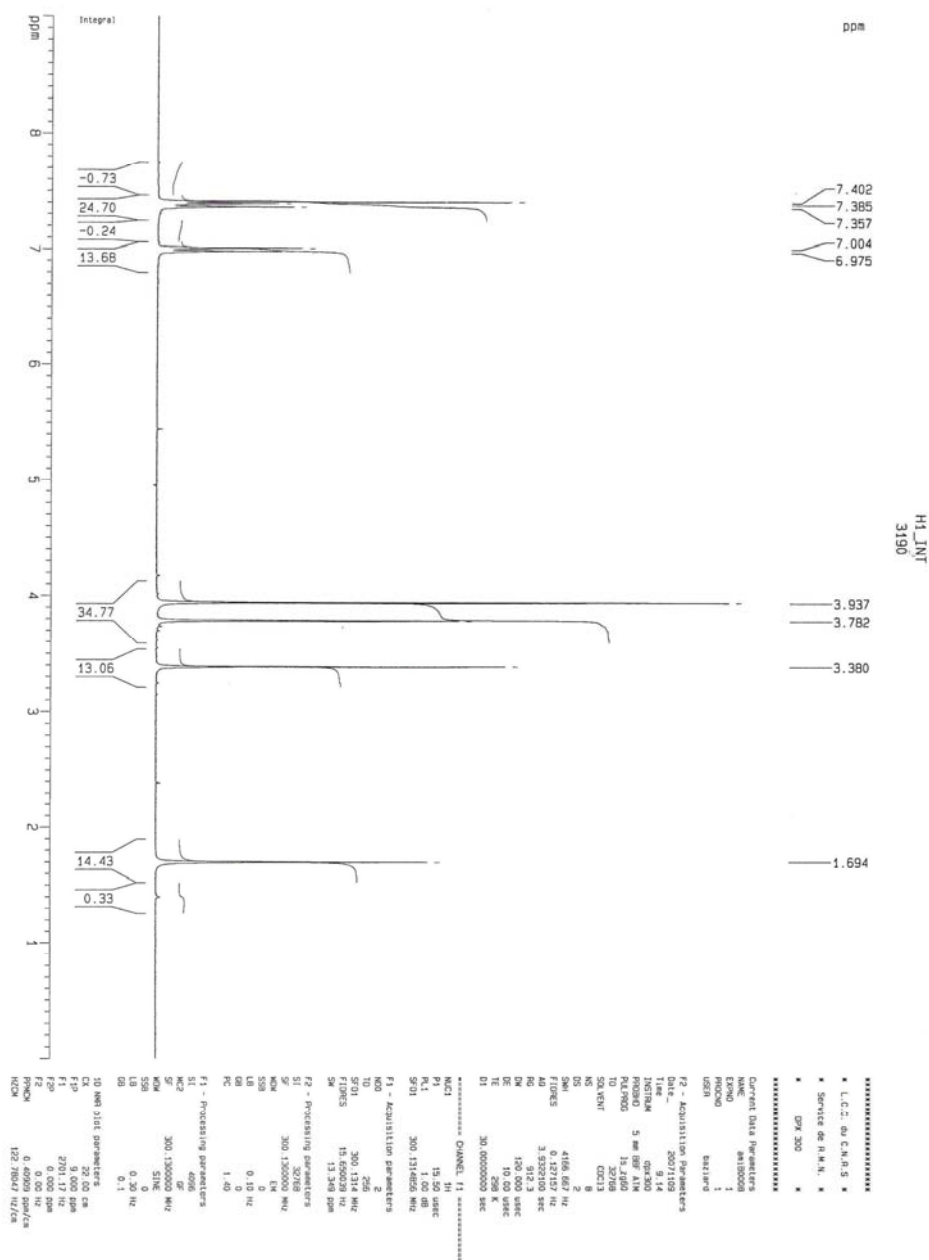
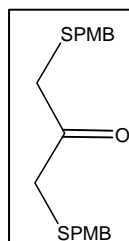


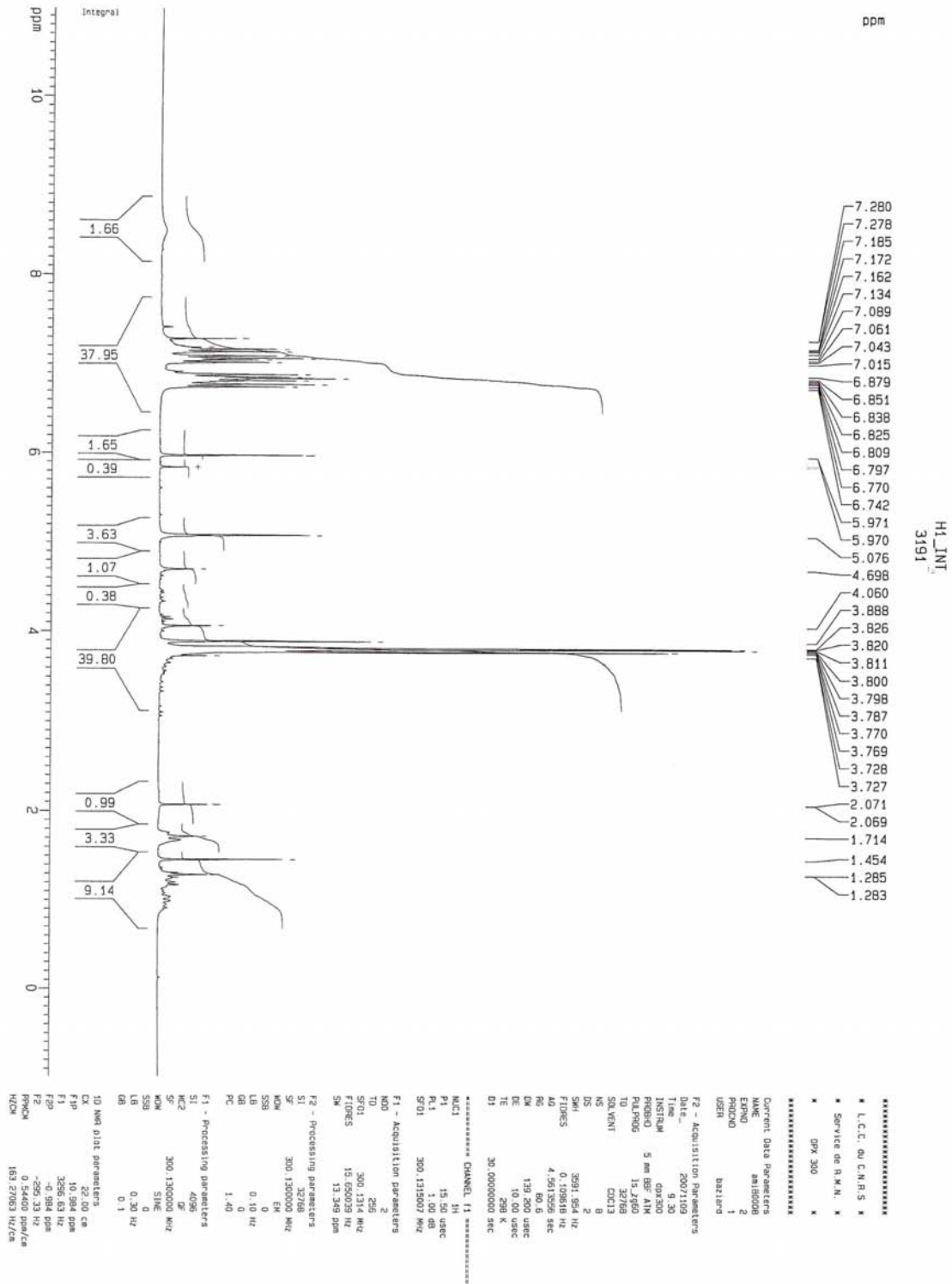
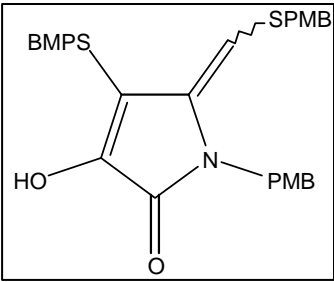
Figure Annexe 2 – 2 Spectre de masse ESI, obtenu par LC-MS, du produit élué à 12,1 min.

ANNEXE 3 : Spectre RMN ¹H obtenus lors de la synthèse de l'holothine

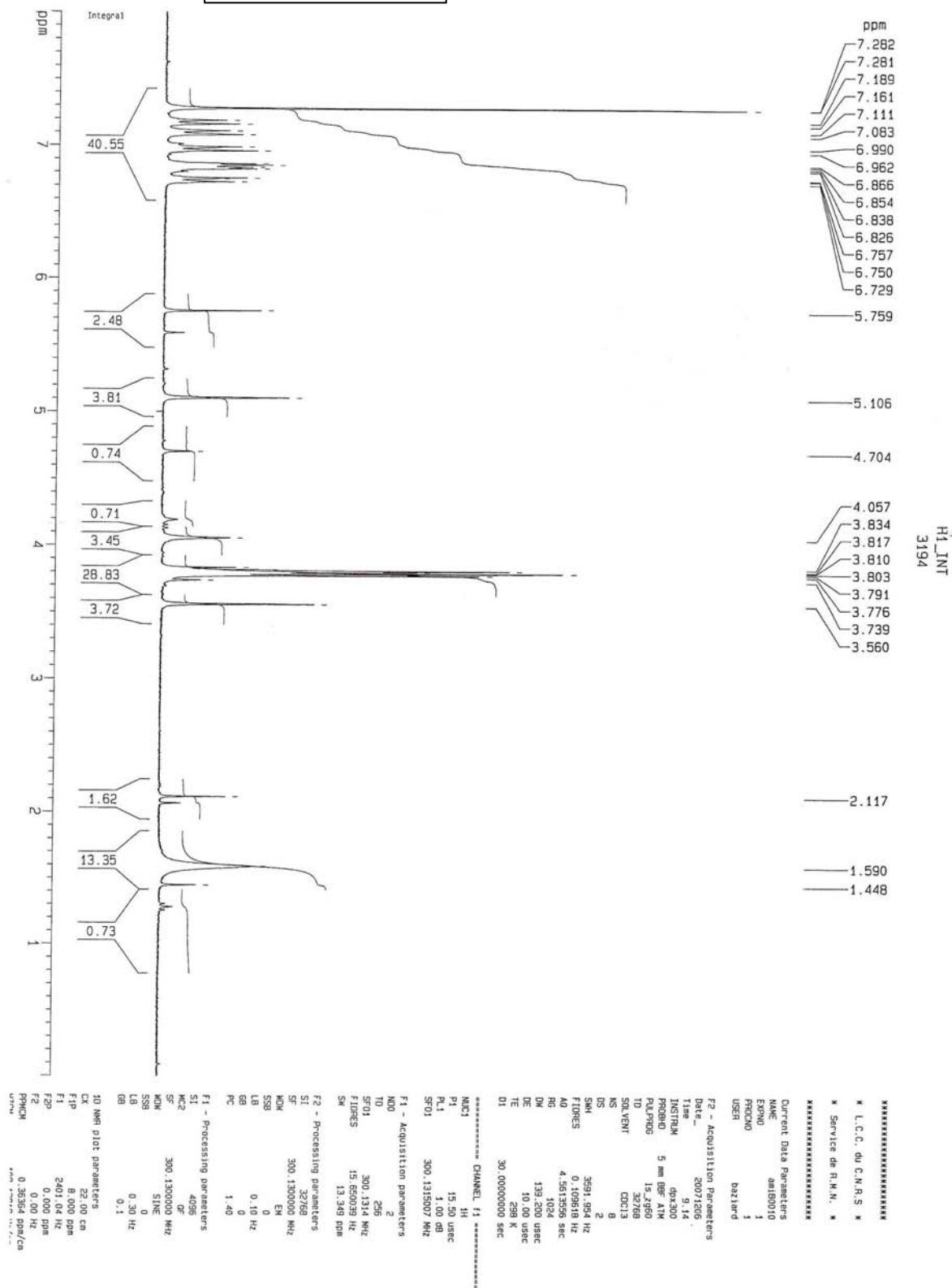
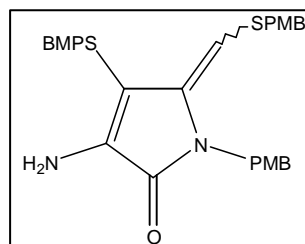
Produit 2 :

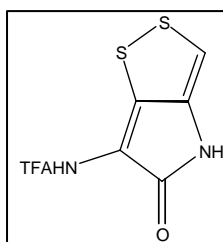


Produit 3 :

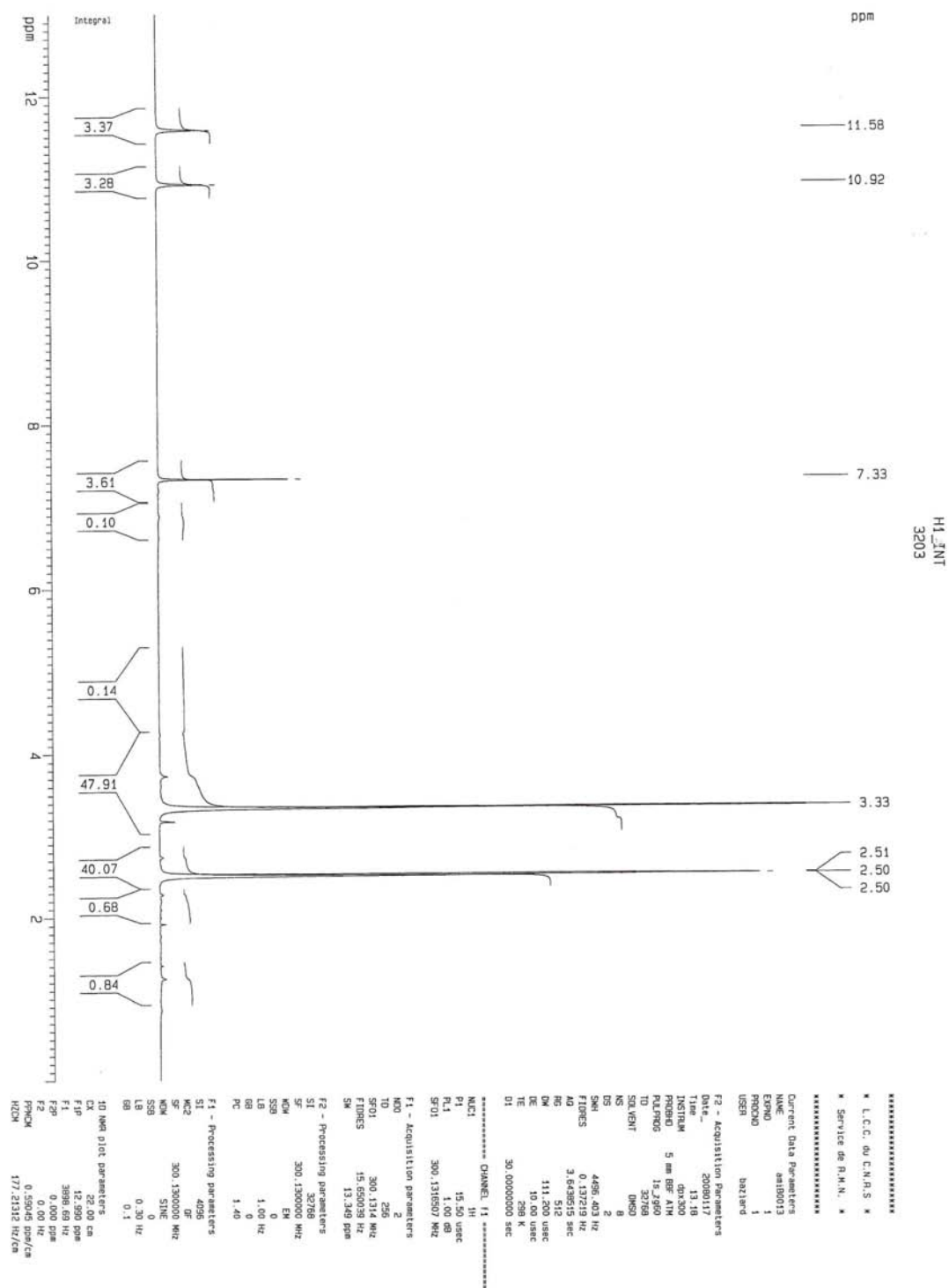


Produit 4 :

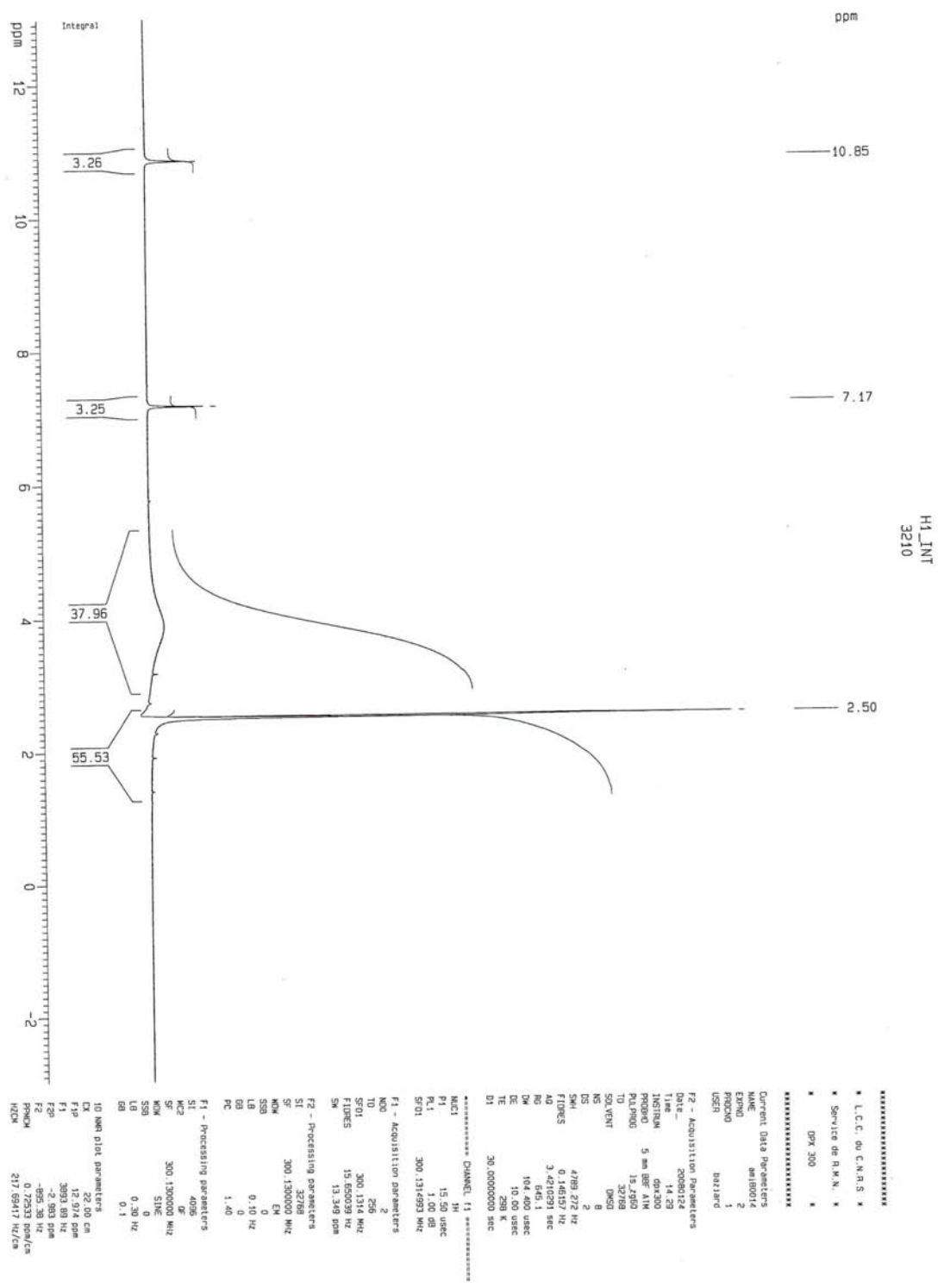
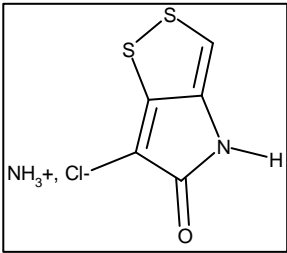




Produit 5 :

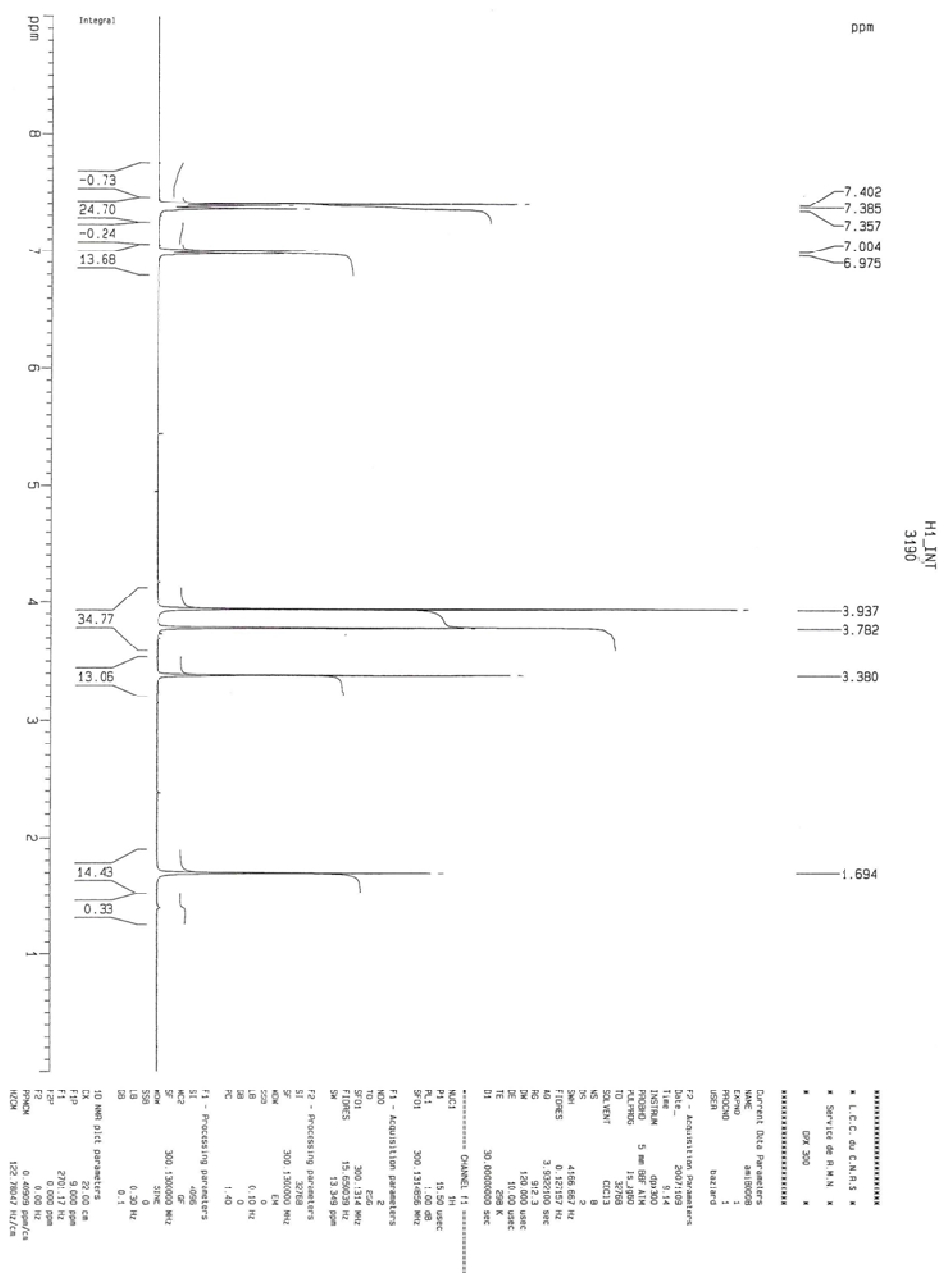
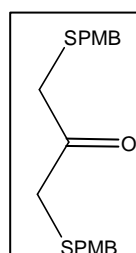


Produit 6, l'holothine :

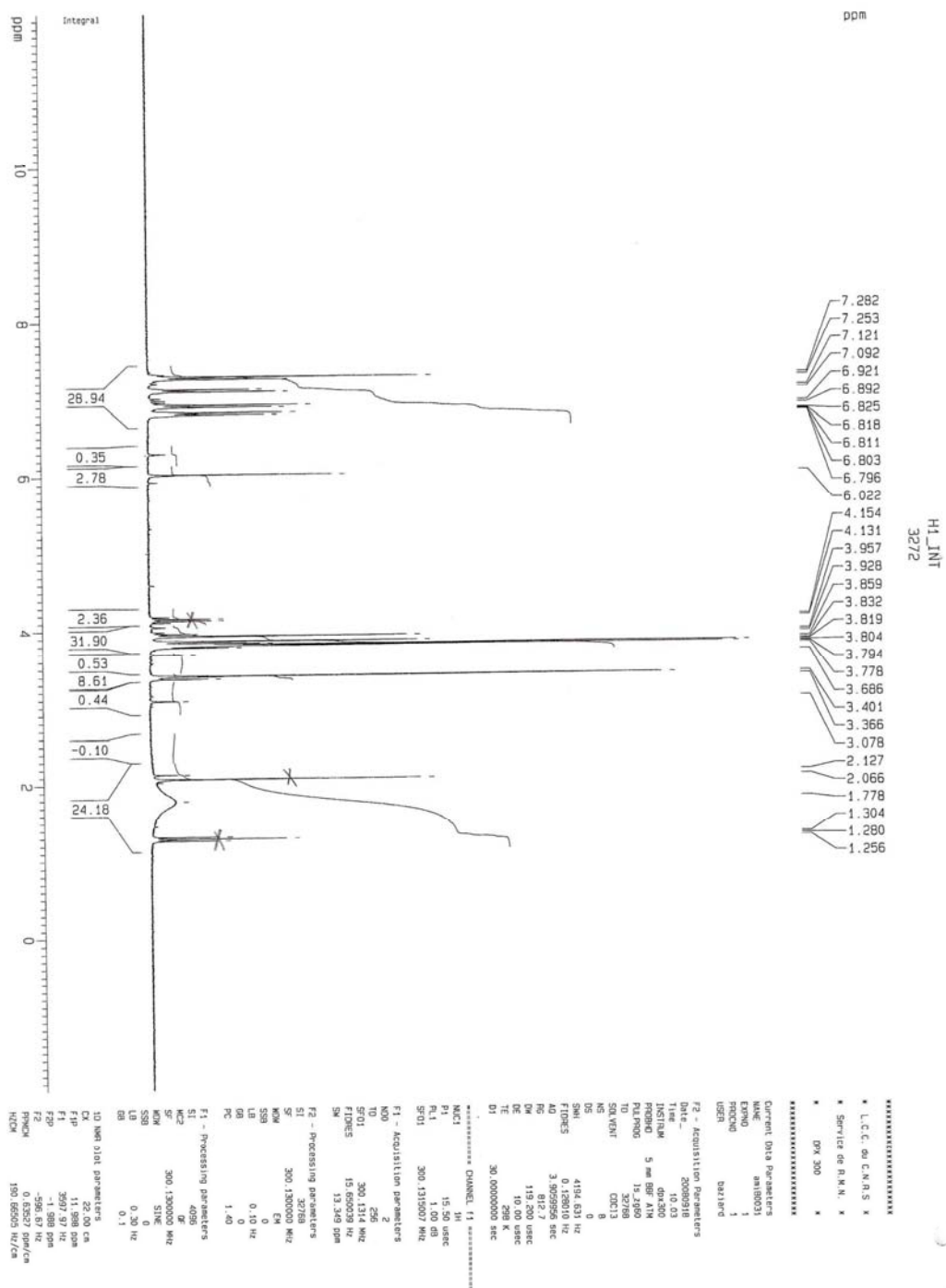
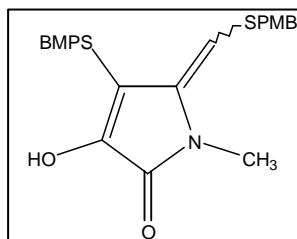


ANNEXE 4 : Spectres RMN ^1H obtenus lors de la synthèse de la pyrrothine

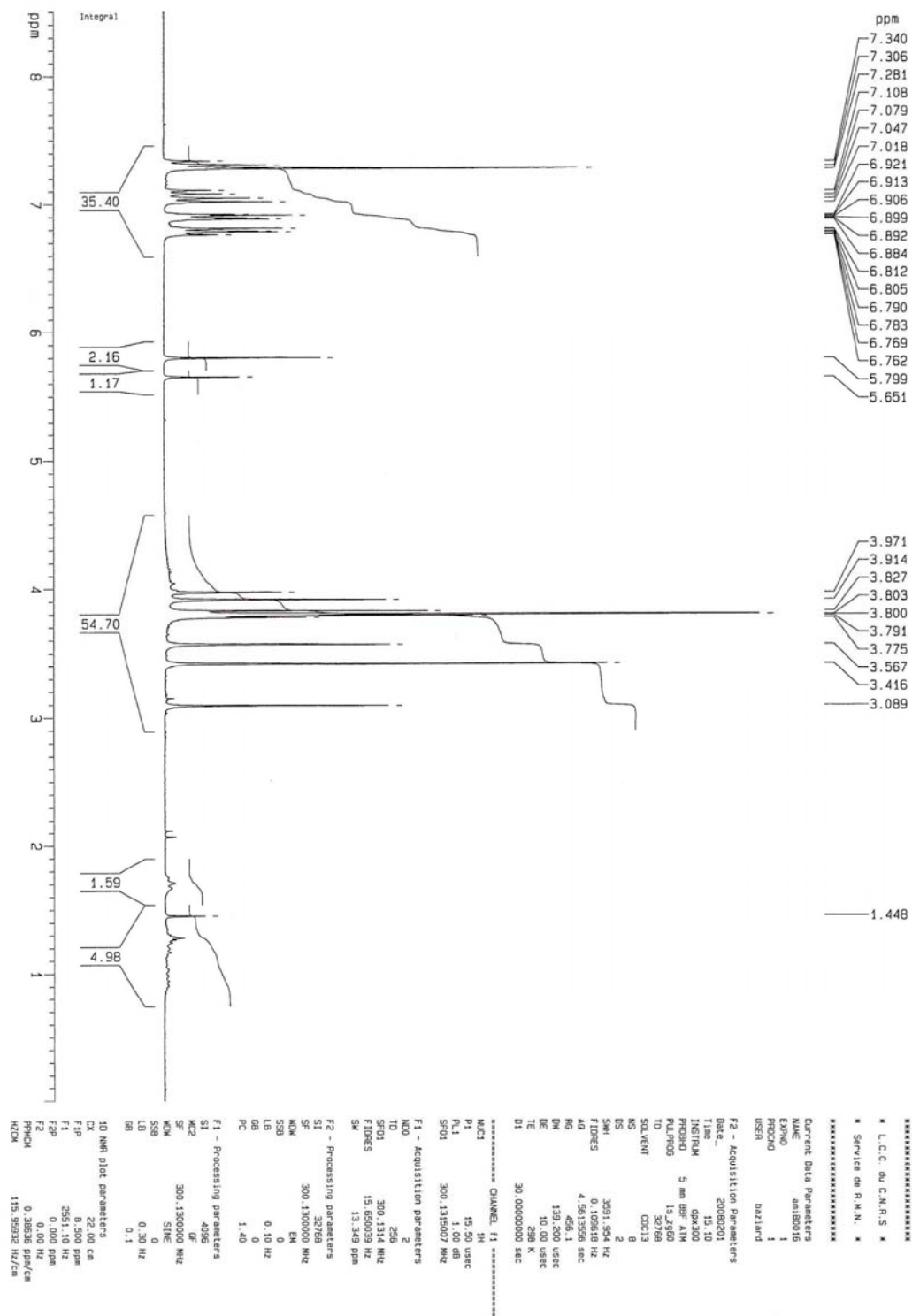
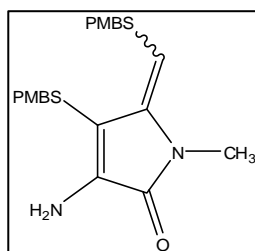
Produit 2 :



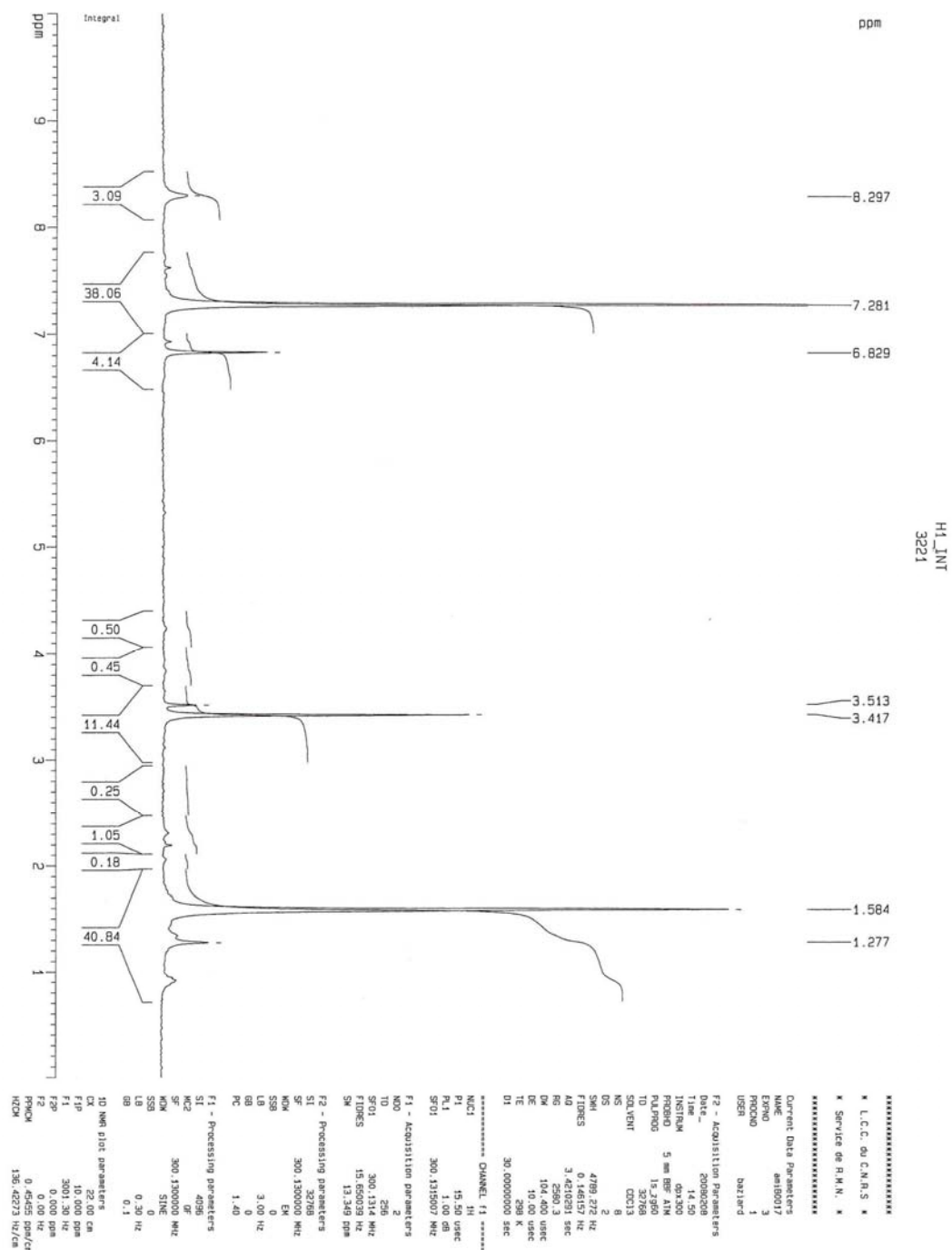
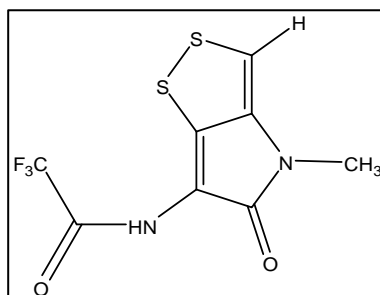
Produit 3 :



Produit 4 :



Produit 5 :



CN1C(=O)c2c(s1)sc(s2)[NH3+].[Cl-]

ANNEXE 5 : Analyse HPLC et spectre UV de la pyrrothine

Pour vérifier la pureté de la pyrrothine obtenue par voie chimique, une solution de pyrrothine à 200 mg L⁻¹ dans un mélange H₂O ultrapure / méthanol (grade HPLC) 50/50 v/v a été analysée par HPLC avec la méthode « pureté pyrrothine chimique » présentée en Tableau Annexe 5 - 1. La phase mobile est composée d'un mélange d'eau ultrapure et de méthanol (grade HPLC). Les analyses sont réalisées à un débit de 0,8 mL min⁻¹ et la colonne est thermostatée à 30 °C. 40 µL d'échantillon sont injectés. L'appareillage utilisé est présenté en II.1, p. 58. Les résultats sont rapportés en Figure Annexe 5 - 2.

Tableau Annexe 5 – 1 Méthode d'analyse « pureté pyrrothine chimique »

	Temps (min)	% H ₂ O ultrapure	% Méthanol (grade HPLC)
Pré-run	-7	70	30
	0	70	30
Run	0	70	30
	15	45	55
	25	0	100
	35	0	100
Post-run	35	0	100
	37	70	30

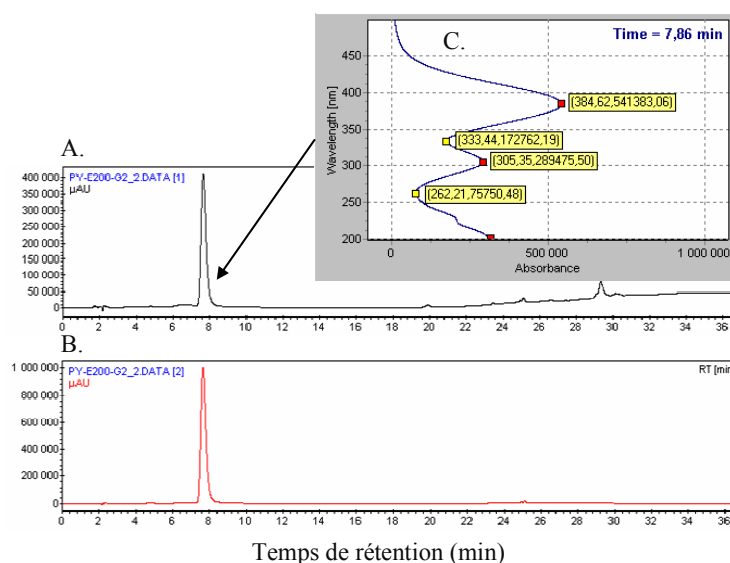


Figure Annexe 5 – 2 Analyse HPLC de la pyrrothine par la méthode « pureté pyrrothine chimique ». A. Détection à 220 nm. B. Détection à 390 nm. C. Spectre UV du pic à Tr = 7,86 min.

ANNEXE 6 : Abaque utilisé pour la réalisation de la précipitation au sulfate d'ammonium

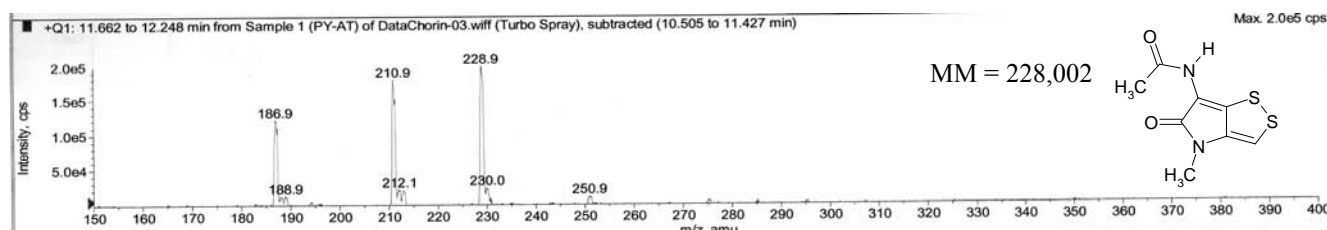
Table 4. The amount of solid ammonium sulphate to be added to a solution to give the desired final saturation at 0°C.

Initial concentration of ammonium sulphate	Final concentration of ammonium sulphate, % saturation at 0°C										
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
0	10.7	13.6	16.6	19.7	22.9	26.2	29.5	33.1	36.6	40.4	44.2
5	8.0	10.9	13.9	16.8	20.0	23.2	26.6	30.0	33.6	37.3	41.1
10	5.4	8.2	11.1	14.1	17.1	20.3	23.6	27.0	30.5	34.2	37.9
15	2.6	5.5	8.3	11.3	14.3	17.4	20.7	24.0	27.5	31.0	34.8
20	0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.5	17.7	21.0	24.4	28.0	31.6
25		0	2.7	5.7	8.5	11.7	14.8	18.2	21.4	24.8	28.4
30			0	2.8	5.7	8.7	11.9	15.0	18.4	21.7	25.3
35				0	2.8	5.8	8.8	12.0	15.3	18.7	22.1
40					0	2.9	5.9	9.0	12.2	15.5	19.0
45						0	2.9	6.0	9.1	12.5	15.8
50							0	3.0	6.1	9.3	12.7
55								0	3.0	6.2	9.4
60									0	3.1	6.3
65										0	3.1
70											0
75											
80											
85											
90											
95											
100											

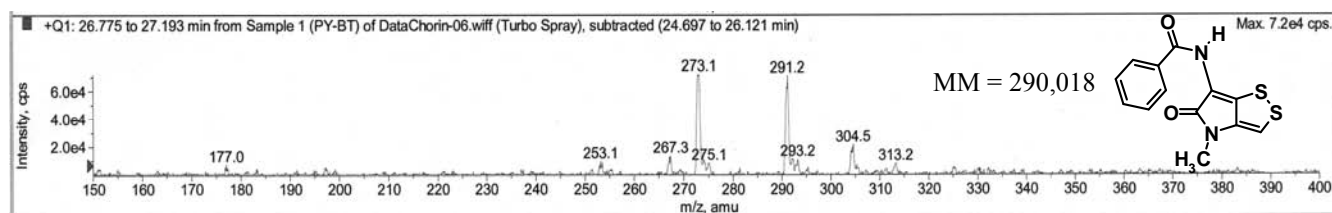
ANNEXE 7 : Spectres de masse des dérivés dithiolopyrrolones synthétisés avec un extrait cellulaire brut de *Sa. algeriensis*

Dérivés pyrrothines

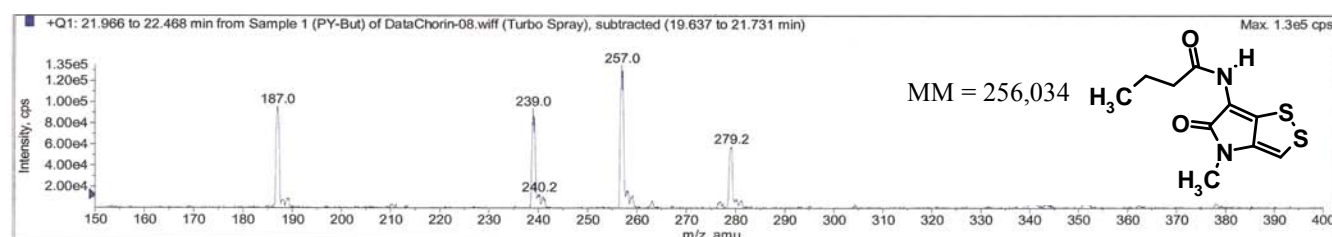
Produit formé avec l'acétyl-CoA :



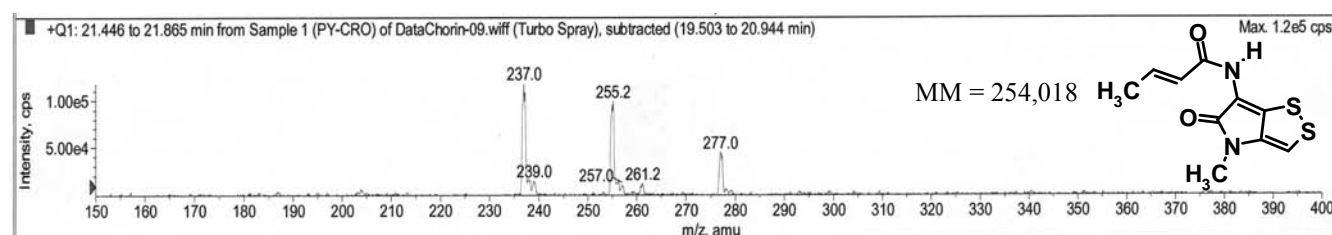
Produit formé avec le benzoyl-CoA :



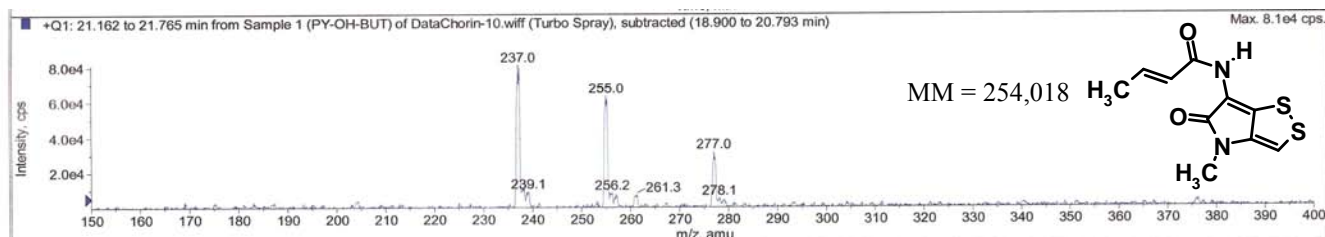
Produit formé avec le butyryl-CoA :



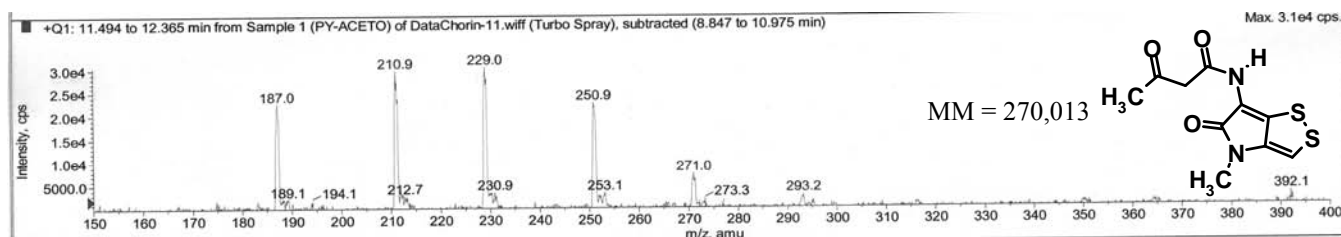
Produit formé avec le crotonoyl-CoA :



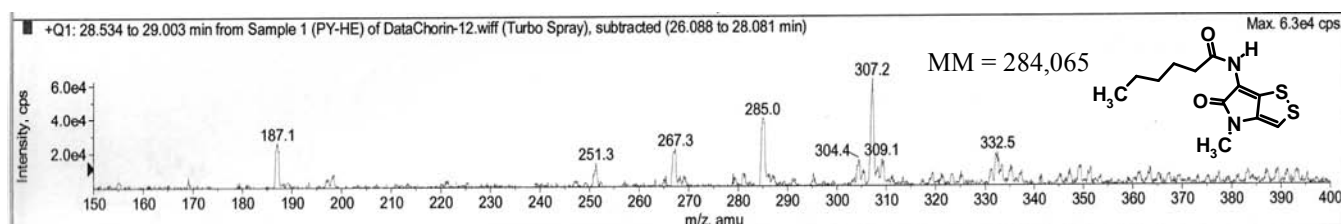
Produit formé avec l'hydroxybutyryl-CoA :



Produit formé avec l'acétoacétyl-CoA :

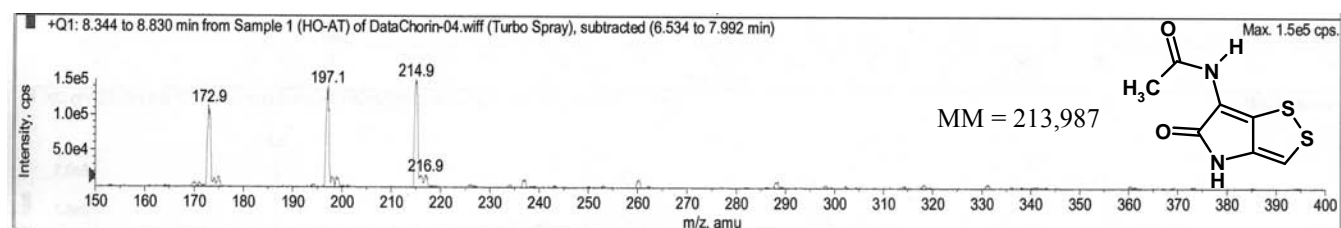


Produit formé avec l'hexanoyl-CoA :

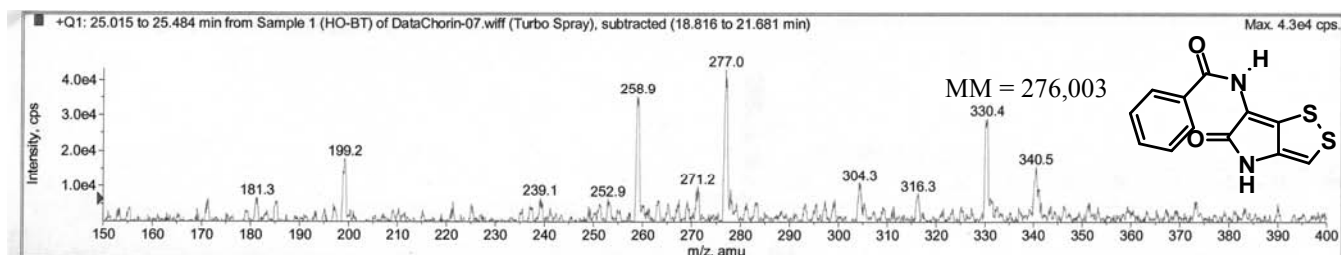


Dérivés holothines

Produit formé avec l'acétyl-CoA :



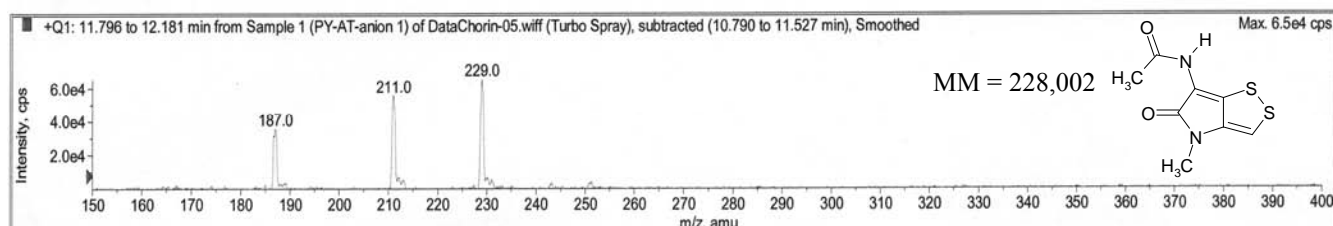
Produit formé avec le benzoyl-CoA :



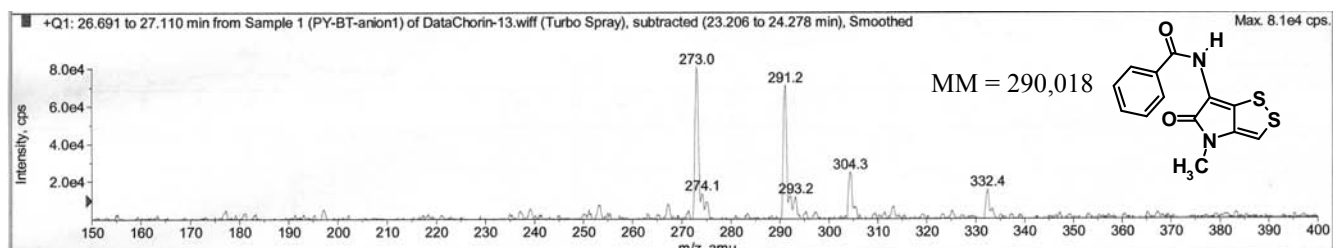
ANNEXE 8 : Spectres de masse des dérivés dithiolopyrrolones synthétisés avec un extrait cellulaire partiellement purifié de *Sa. algeriensis*.

Dérivés pyrrothines

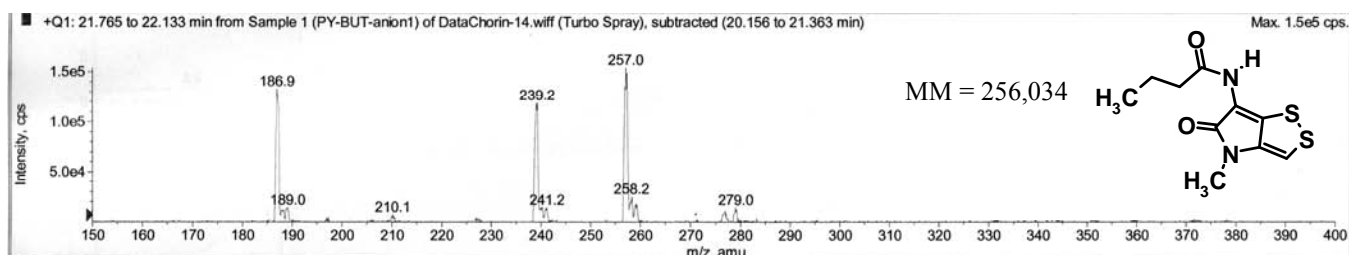
Produit formé avec l'acétyl-CoA :



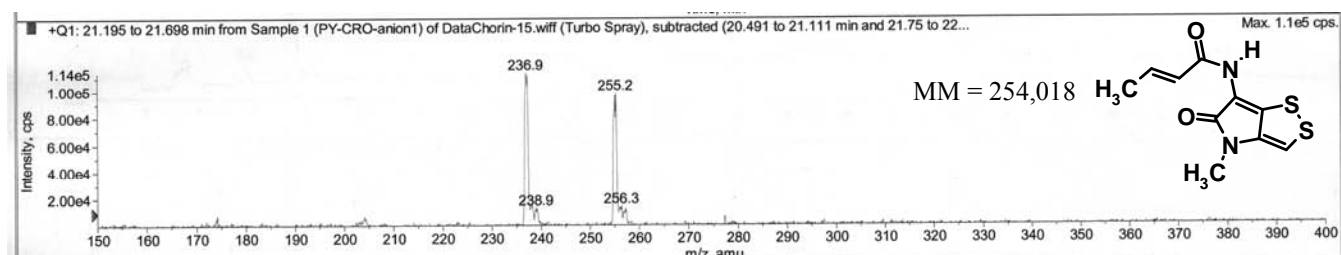
Produit formé avec le benzoyl-CoA :



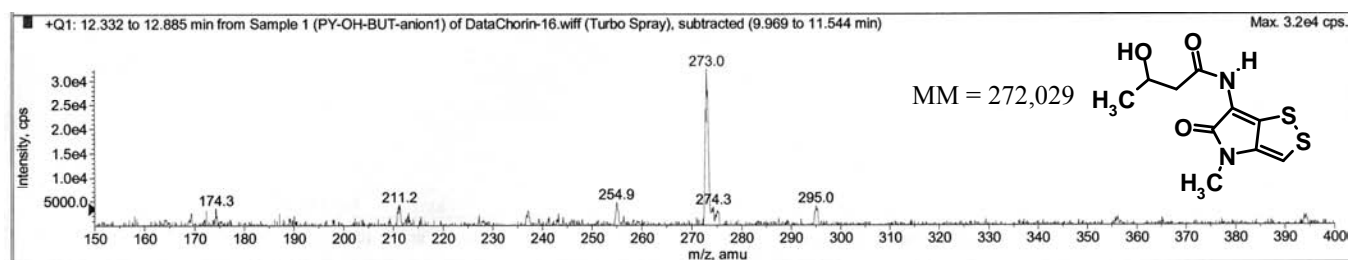
Produit formé avec le butyryl-CoA :



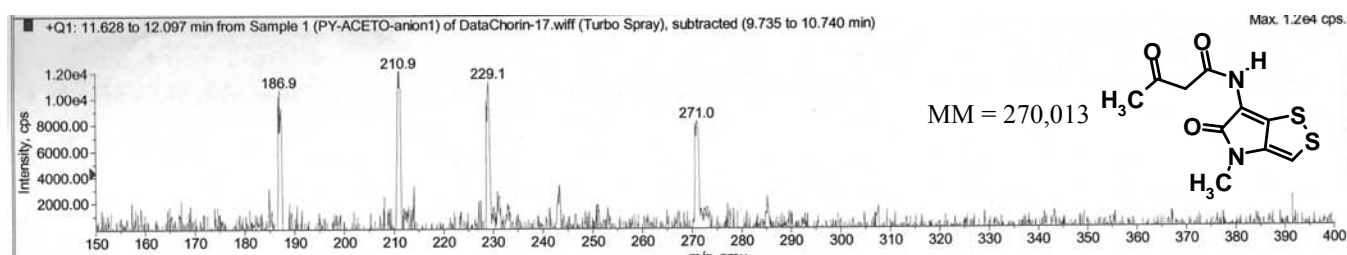
Produit formé avec le crotonoyl-CoA :



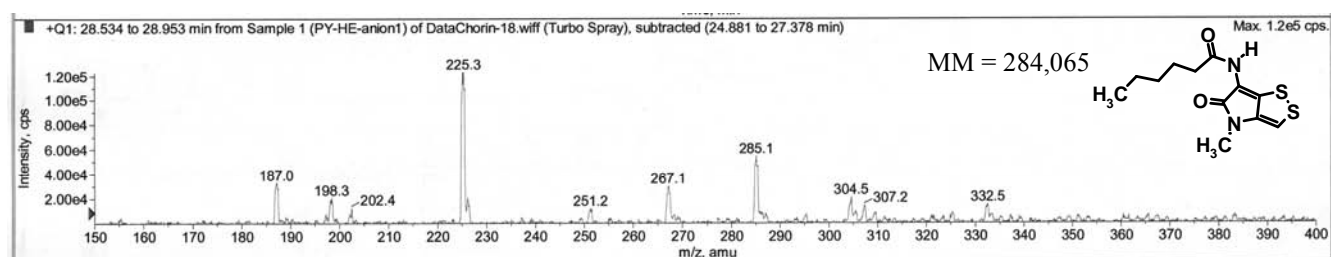
Produit formé avec l'hydroxybutyryl-CoA :



Produit formé avec l'acétoacétyl-CoA :



Produit formé avec l'hexanoyl-CoA :



ANNEXE 9 : Publication acceptée

L'article suivant est accepté pour publication dans *Journal of Applied Microbiology* (DOI : 10.1111/j.1365-2672.2009.04496.x). Je remercie le journal, the Society for Applied Microbiology et Blackwell Publishing qui autorisent la publication en ligne de cet article. La version définitive est disponible sur blackwell-synergy.com.

Expression of pyrrothine N-acyltransferase activities in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137: new insights into dithiolopyrrolone antibiotic biosynthetic pathway.

A.C. CHORIN*, L. BIJEIRE†, M.C. MONJE*, G. BAZIARD†, A. LEBRIHI* and F. MATHIEU*.

* Université de Toulouse, Laboratoire de Génie Chimique UMR 5503 (CNRS/INPT/UPS), ENSAT-INP de Toulouse, 1 Avenue de l'Agrobiopôle, B.P. 32607, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex 1, France.

† Université de Toulouse, LU 49 Laboratoire de Chimie Pharmaceutique, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, F-31062 Toulouse Cedex 9, France.

Abbreviated headline: Dithiolopyrrolone biosynthesis

Author for correspondence:

Ahmed LEBRIHI. Université de Toulouse, Laboratoire de Génie Chimique UMR 5503 (CNRS/INPT/UPS), ENSAT-INP de Toulouse, 1 Avenue de l'Agrobiopôle, B.P. 32607, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex 1, France. Phone: +33562193972. Fax: +33562193901. E-mail: lebrihi@ensat.fr

ABSTRACT

Aims: The hypothetical dithiolopyrrolone biosynthetic pathway includes a final step of pyrrothine nucleus acylation. The presence of an enzymatic activity catalyzing this reaction was investigated in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. To understand the effect exerted by organic acids on the level of dithiolopyrrolone production, their influence on enzymatic expression was studied.

Methods and results: The transfer of acetyl-CoA or benzoyl-CoA on pyrrothine was assayed in the cell-free extract of *Sa. algeriensis* NRRL B-24137. This study reports the presence of an enzymatic activity catalyzing this reaction that was identified as either pyrrothine N-acetyltransferase or N-benzoyltransferase. The stimulation of benzoyl-pyrrothine (BEP) production by addition of benzoic acid at 1.25 mM into the culture medium was demonstrated and results showed that under the same conditions of growth, pyrrothine N-benzoyltransferase specific activity was doubled.

Conclusions: This study shows that BEP production is enhanced in the presence of benzoic acid partly because of an induction of pyrrothine N-benzoyltransferase.

Significance and impact of study: The anti-tumor and antibiotic properties of dithiolopyrrolones are related to their variable acyl groups. New insights into regulation of biosynthetic pathway, especially the step of pyrrothine acylation, could lead after further studies to yield improvement and to selective production of dithiolopyrrolones with new biological activities.

Keywords: *Saccharothrix algeriensis*, dithiolopyrrolone biosynthesis, antibiotic synthases regulation.

INTRODUCTION

Saccharothrix algeriensis NRRL B-24137 is a filamentous bacterium that produces bioactive metabolites belonging to the dithiolopyrrolone class of antibiotics (Lamari *et al.* 2002a, b; Zitouni *et al.* 2005). Dithiolopyrrolones possess a common pyrrolinonodithiole nucleus linked to two variable groups R1 and R2 (Figure 2A). *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 produces at least six pyrrothine derivatives characterized by their different *N*-acyl groups R2: thiolutin (acetyl-pyrrothine), senecioid-pyrrothine (SEP), tigloyl-pyrrothine (TIP), isobutyryl-pyrrothine (ISP), butanoyl-pyrrothine (BUP) and benzoyl-pyrrothine (BEP) (Lamari *et al.* 2002a, b) (Figure 2B). Pyrrothine derivatives differ from holothin derivatives by the presence of a methyl radical R1 linked to the N₄ cyclic nitrogen.

Many bacteria have been identified as dithiolopyrrolones producers among the genera *Streptomyces* (Celmer *et al.* 1952; Bhate *et al.* 1960), *Xenorhabdus* (Li *et al.* 1995) or *Alteromonas* (Shiozawa *et al.* 1993); however *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 is the first producer identified within the *Saccharothrix* genus. In addition, naturally occurring and other dithiolopyrrolones can be also produced by multiple-step chemical synthesis (Büchi and Lukas 1964; Hagio and Yoneda 1974; Ellis *et al.* 1977; Hjelmgård *et al.* 2007; Li *et al.* 2007).

Dithiolopyrrolones exhibit broad-spectrum antibiotic activity against a variety of Gram-negative and Gram-positive bacteria, fungi (Lamari *et al.* 2002a) and even protozoa and insects (Mc Inerney *et al.* 1991). They also inhibit allergy (Stahl *et al.* 1988) and platelet aggregation (Ninomiya *et al.* 1980). Moreover, dithiolopyrrolones generated new interests in the 1990s after the discovery of their anti-tumour properties. Thiolutin suppresses tumour cell-induced angiogenesis (Minamigushi *et al.* 2001) and a variety of dithiolopyrrolones show strong cytotoxic activities against human cancer cell lines, especially breast, colon and cervical ones (Webster *et al.* 2000). Guo *et al.* (2008) have recently described some new

chemically synthesized dithiolopyrrolones that promote production of white blood cells. They could be useful in the prevention and treatment of microbial infections such as HIV infections and for the treatment of blood disorders.

Biological activity of dithiolopyrrolones is strongly influenced by the nature of variable groups (Oliva *et al.* 2001; Chen *et al.* 2006; Li *et al.* 2007; Guo *et al.* 2008). As a consequence, it is important to have the means to influence the type of dithiolopyrrolone produced. Unfortunately, little is known about the dithiolopyrrolone biosynthetic pathway to date. A single putative pathway was described by Furumai *et al.* (1982) (Figure 3). L-cystine has been identified as the potential precursor of pyrrothine nucleus. Amide bond formation between pyrrothine and an activated organic acid would lead to dithiolopyrrolone synthesis. The presence of one enzymatic activity that catalyzes amide bond formation between the holothine nucleus (deacetyl-holomycin) and acetyl-CoA was confirmed in cell-free extracts of *Streptomyces clavuligerus* mutants, which are producers of holomycin (De La Fuente *et al.* 2002), but the enzyme responsible for this activity has not been purified yet. Additionally, the influence of medium composition has provided some information on the biosynthetic pathway in *Sa. algeriensis* NRRL B-24137. Addition of supposed precursors into the culture medium, such as organic and amino acids, led to modifications in dithiolopyrrolone production levels (Bouras *et al.* 2006a, b; Bouras *et al.* 2007) and to precursor-directed biosynthesis of new dithiolopyrrolone analogs (Bouras *et al.* 2008). However little is known about enzymes involved in the biosynthesis of dithiolopyrrolones by this strain.

To get a better understanding of dithiolopyrrolone biosynthetic pathway in *Sa. algeriensis* NRRL B-24137, the enzymatic reaction of pyrrothine nucleus acylation (pyrrothine N-acyltransferase activity) was investigated. For the first time, this study looks into the mechanism involved in the precursor-directed biosynthesis of dithiolopyrrolones by *Sa. algeriensis* NRRL B-24137. It leads to new insights into biosynthetic pathway regulation

and thus could result in production yield improvement and to selective production of new and specific dithiolopyrrolones.

MATERIALS AND METHODS

Producing strain

Sa. algeriensis NRRL B-24137 (= DSM 44581) was used for this study. A stock of spores was prepared to maintain the strain. *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 was grown on International *Streptomyces* Project 2 (ISP2) agar plates for 7 days at 30 °C. Spores were suspended in 0.1 % Tween 80 (Fisher, Waltham, MA, USA), harvested and stored in 25 % glycerol (Fisher) at -24 °C.

Culture media

ISP2 was composed (per litre of distilled water) of: 10 g D (+) glucose (Acros, Geel, Belgium), 10 g malt extract (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, USA), 4 g yeast extract (Difco) and 18 g agar (Difco). pH was adjusted to 7 with 2 N NaOH (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) before autoclaving for 20 min at 121 °C.

SS medium (SSM) developed in our laboratory was used for growth and antibiotic production (Bouras *et al.* 2006a) with 15 g L⁻¹ of D (+) glucose (Acros). Organic acids were autoclaved separately and added aseptically to the culture medium, at the required concentration, before inoculation. The effect of organic acids on the time course of antibiotic production and enzymatic expression was investigated with 1.25 mM of benzoic acid (Acros) or 5 mM of acetic acid (Sigma Aldrich). The influence of organic acid concentration on maximal enzymatic expression was studied by the addition of benzoic acid at concentrations of 0, 0.5, 2.5 and 5 mM and by the addition of acetic acid at concentrations of 0, 2.5, 5 and 7.5 mM.

Culture conditions

ISP2 agar plates were inoculated with 50 μ L of spore stock, i.e. 2×10^7 colony forming units, and incubated for 7 days at 30 °C for spore production. Pre-cultures were inoculated with spores harvested from one ISP2 agar plate. They were grown in 250-mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of SSM and incubated during 48 h. Cultures were grown in 500-mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of SSM which was, in some cases, supplemented with organic acids. They were inoculated with 5 mL of homogenized pre-culture. All liquid cultures were incubated at 30 °C and 240 RPM on a rotary shaker (New Brunswick Scientific Company, NJ, USA).

Dry Cell Weight (DCW) measurement

Culture broth samples of 4 mL were taken every 12 h of fermentation and centrifuged at 16,000 x g for 10 min in pre-weighed-Eppendorf tubes (centrifuge Biofuge pico, Heraeus Instruments, Hanau, Germany). Dry cell weights (DCW) were determined as described by Bouras *et al.* (2006a) and expressed in g L⁻¹.

Dithiolopyrrolone extraction

A volume of 3.2 mL of supernatant fluid was extracted twice with 1.6 mL of dichloromethane. Organic phases containing antibiotics were pooled and dried under vacuum in a speed-vac (Genevac, Ish, UK) at a temperature maintained under 40 °C. Dry extracts were dissolved in 0.8 mL of methanol (HPLC grade, Fisher) for dithiolopyrrolone quantification by high performance liquid chromatography (HPLC).

Pyrrothine synthesis

6-amino-4-methyl-[1,2]dithiolo[4,3-*b*]pyrrol-5-one hydrochloride, also called pyrrothine, was synthesized by multiple-step chemical synthesis using the protocol of Hjelmgaard *et al.* (2007) with slight modifications as described in Figure 4. Especially, the methyl group on cyclic nitrogen was introduced during the step (b) by substituting p-methoxybenzylamine by methylamine. Finally, the amide moiety of the trifluoroacetyl-

pyrrothine (5) was hydrolysed (f) in methanol in presence of concentrated HCl to afford the pyrrothine hydrochloride (6) that was recovered by filtration. The ^1H NMR spectrum, obtained on a DPX 300 MHz spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA), confirmed that precipitate is pyrrothine hydrochloride: δ_{H} (DMSO, d_6): 7.41 (1H, s, C=CH) 3.9-5.3 (1H, br s, NH_3^+) 3.27 (3H, s, CH_3).

Cell-free extract preparation

Sa. algeriensis NRRL B-24137 was grown in SSM or SSM supplemented with organic acids as described in the section “culture conditions”. The biomass was recovered by centrifugation of culture broth at 5,000 x g for 15 min (4K15, Sigma, Osterode am Harz, Germany), then washed twice with physiological water (0.9 % NaCl), and once with lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 8). Wet cells were finally recovered by filtration on 0.2 μm membrane filters (Advantec, Dublin, Ireland). 0.6 g of wet cells were re-suspended in 1 mL of lysis buffer and transferred to a Fast Protein Blue tube (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA). Two disruption cycles (30 sec, 5 m s^{-1}) were carried out in a Fast Prep disruptor (MP Biomedicals, California, USA). The lysing matrix was discarded and then the sample was centrifuged at 10,000 x g for 30 min (centrifuge 1-15K, Sigma, Missouri, USA) to remove the cell debris. The supernatant fluid constituting the soluble cell-free extract of *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 was used immediately for the assay of pyrrothine N-acyltransferase activity. A sample was frozen at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ for further protein assays. Samples were always kept in ice and centrifugations were carried out at $4\text{ }^\circ\text{C}$.

Pyrrothine N-acyltransferase assay

Pyrrothine N-acyltransferase activity was assayed in a final volume of 100 μL . The reaction mixture contained 80 μL of cell-free extract in Tris-HCl buffer (50 mM, pH 8), 10 μL of acetyl- or benzoyl-coenzyme A at 5 mM in bidistilled water and 10 μL of pyrrothine hydrochloride at 2.5 mM in methanol (Fisher, HPLC grade). The reaction mixture was

incubated at 30 °C for 5 and 10 min. The reaction was stopped by adding fresh 2.5 % w v⁻¹ trichloroacetic acid (Fisher). The cell-free extract was properly diluted with Tris-HCl buffer (50 mM, pH 8) before assay to observe a product formation linear in time within 10 min.

Enzymatic activity was identified as either acetyltransferase or benzoyltransferase activity according to the acyl group donor used during the assay, i.e. acetyl-CoA and benzoyl-CoA respectively. A unit of enzyme is defined as the enzyme activity producing 1 μmol of thiolutin (acetyl-pyrrothine) or benzoyl-pyrrothine per minute. Specific enzymatic activity was expressed in μU mg⁻¹ of protein.

Enzymatic activity was also expressed in mU g⁻¹ of DCW. A value of 162 mg of proteins per gram of dry cells was used to achieve conversion from U mg⁻¹ of proteins to U g⁻¹ of DCW. Protein content in dry cells was determined as follow. DCW and intracellular protein concentration were determined every 24 h, for 7 days, in a culture of *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 on SSM. The plot of proteins in mg L⁻¹ versus DCW in g L⁻¹ indicated a linear correlation between the two parameters with a slope of 162 mg of proteins g⁻¹ of DCW ($R^2 = 0.91$).

High performance liquid chromatography analysis for dithiolopyrrolone quantification

Dithiolopyrrolones were quantified by HPLC (Bio-tek instruments, Milan, Italy). The analytical column was ProntoSIL 120-5-C₁₈ SH, 150 × 4.6 mm (Bischoff chromatography, Leonberg, Germany) fitted with a guard column of 10 × 4 mm and detection was achieved with a diode array detector (UV-vis 545 V, Bio-tek instruments).

For detection and quantification of thiolutin and BEP produced in the culture medium, analyses were performed as described by Bouras *et al.* (2006a) with an injection volume of 80 μL.

For detection and quantification of dithiolopyrrolones formed during enzymatic assay, analyses were performed in the following chromatographic conditions. Samples were analyzed by linear gradient elution using a mixture of methanol/bidistilled water (solvent A/solvent B) as mobile phase and a flow rate of 0.8 mL min⁻¹. Column temperature was maintained at 30 °C and injection volume was 40 µL. UV detection of antibiotics was carried out at 390 nm. For the acetyltransferase assay, elution was carried out with a linear gradient from 30 % A to 47 % A in 17 min. Pyrrothine and thiolutin retention times (R_t) were 7 and 12.3 min respectively. For the benzoyltransferase assay, the mobile phase composition was 30 % A, reached 45 % A in 15 min, 100 % A in 35 min and was finally kept at this value for 2 min. Pyrrothine and BEP retention times (R_t) were 8 and 29 min respectively.

Both antibiotics were quantified using a thiolutin standard calibration curve. Indeed, the molar absorptivity values at 390 nm of pyrrothine derivatives are close. ϵ^{390} is in the range of 8317 to 9333 M⁻¹ cm⁻¹ as described by Lamari *et al.* (2002b).

The BEP chemical structure was confirmed by comparison of the UV spectrum obtained with those mentioned by Bouras *et al.* (2008). The UV spectrum of benzoyl-pyrrothine yielded λ_{\max} in nm (relative absorbance): 231 (1), 309 (0.45), 401 (0.68).

Replication of experiments and statistical analysis

Data of growth and dithiolopyrrolone production represent the average of triplicate flasks and error bars denote standard errors.

Values of acyltransferase specific activities at 24 h and 48 h on SSM, SSM with benzoic acid at 1.25 mM and SSM with acetic acid at 5 mM are the averages of four independent experiments and error bars denote standard errors. Other pyrrothine N-acyltransferase specific activities are single values and error bars denote a standard error of 15 %, estimated from previous replications.

Statistical analyses were achieved using Kaleida Graph 4.0 software (Synergy Software, Reading, PA, USA).

RESULTS

Involvement of pyrrothine N-acyltransferase activities in thiolutin and benzoyl-pyrrothine production

N-acyltransferase enzymatic activity was assayed in the cell-free extract of *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 grown on SS medium. A formation of thiolutin or BEP, linear in time within 10 min, was monitored by HPLC when acetyl-CoA and benzoyl-CoA were respectively used as acyl group donors (Figure 5). No thiolutin or BEP was observed in the absence of one of the components of the reaction mixture, i.e., acyl-CoA, cell-free extract or pyrrothine. Hence, it can be concluded that both pyrrothine N-acetyltransferase and pyrrothine N-benzoyltransferase enzymatic activities are present in the cell-free extract of *Sa. algeriensis* NRRL B-24137.

Biomass, thiolutin and BEP productions on SSM

DCW and dithiolopyrrolone concentrations were quantified during growth on SSM (Figure 6A). Time courses of specific growth rate, thiolutin specific production and BEP specific production on SSM are shown in Figure 7A.

Two distinct periods of growth were observed. Each growth period is characterized by an increase in the specific growth rate followed by a decrease in the same. Between 0 and 48 h, specific growth rate reached the maximal value of 0.096 h^{-1} at 12 h and then decreased up to 0.010 h^{-1} at 48 h. At the end of this first period of growth, a DCW of 1.2 g L^{-1} was observed. Between 60 h and 96 h, the specific growth rate increased again to the maximal value of 0.022 h^{-1} at 60 h and then decreased to zero at 96 h. The maximal specific growth rate during this second period was 4.4 times lower than the earlier one. The maximal level of

DCW, 2.5 g L^{-1} was attained at 96 h. Biomass finally dropped after 108 h probably because of cell lysis.

Thiolutin and BEP production started at 24 h and 36 h of culture respectively. At 72h of culture, the maximal level of thiolutin, 25.6 mg L^{-1} , was observed. Then, the thiolutin concentration in the culture medium decreased. A BEP production of 0.15 mg L^{-1} was reached as early as 48 h, i.e 80 % of the maximal BEP concentration, 0.18 mg L^{-1} , observed only at 144 h. Maximal specific productions of thiolutin and BEP were reached after 48 h of culture at the end of the first growth period, when the specific growth rate was at its lowest level, 0.010 h^{-1} . Maximal specific productions of 20 mg g^{-1} and 0.12 mg g^{-1} were respectively observed for thiolutin and the BEP. The maximal specific production rate of thiolutin, $0.70 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ was reached at 24 h and the maximal specific production rate of BEP, $0.006 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ was observed at 36 h when the specific growth rate was reduced to 26.5 and 12 % of its maximal level respectively.

Addition of benzoic acid and acetic acid to the culture medium

Time courses of growth, thiolutin production and BEP production on SSM completed with benzoic acid at 1.25 mM are shown in Figure 6B. Time courses of specific growth rate, thiolutin specific production and BEP specific production on SSM supplemented with benzoic acid at 1.25 mM are shown in Figure 7B. A maximal BEP production of 8.47 mg L^{-1} was observed at 72 h. This is 56 times more than on SSM. We observed a BEP maximal specific production of 4.77 mg g^{-1} at 60 h, i.e. a value 39 times higher than without benzoic acid in culture medium. Additionally, the maximal specific production rate of BEP, $0.15 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ at 36 h, was 25 times higher than the one on SSM. By contrast, thiolutin production and growth were not significantly modified by benzoic acid addition.

DCW and dithiolopyrrolone concentrations were also quantified in a *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 culture on SSM completed with acetic acid at 5 mM (Figure 6C). Specific

growth rate, thiolutin specific production and BEP specific production are shown in Figure 7C. A maximal thiolutin concentration of 9.68 mg L^{-1} was observed at 72 h which is 2.6 times less than on SSM. Data also showed that thiolutin specific production reached a maximal value of 6.53 mg g^{-1} at 48 h, i.e. three times lower than that on SSM. The maximal specific production rate of thiolutin was also reduced by acetic acid addition. The value of $0.23 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, three times lower than the one on SSM, was reached at 24 h. On the contrary, acetic acid addition did not significantly modify BEP production and growth.

Expression of pyrrothine N-acyltransferase activities on SSM

Time courses of acetyltransferase and benzoyltransferase specific activities during growth on SSM are shown in Figure 8A.

Acetyltransferase specific activity peaked at 24 h and the peak-value was $18,823 \text{ } \mu\text{U mg}^{-1}$ of protein. Then, enzymatic specific activity decreased sharply. At 48 h, expression was already seven times lower.

Benzoyltransferase activity was detected from 24 h and reached its maximal value of $9,450 \text{ } \mu\text{U mg}^{-1}$ of protein after 48 h of culture while acetyltransferase specific activity was already reduced to 40 % of its maximal level. Then it decreased down to $1,760 \text{ } \mu\text{U mg}^{-1}$ at 84 h. At 96 h of culture a new increase in specific activity was observed until the maximal value of $3,690 \text{ } \mu\text{U mg}^{-1}$ of protein was reached. Then activity decreased down to $1,800 \text{ } \mu\text{U mg}^{-1}$ at 144 h and remained stable until 168 h of culture.

From both profiles comparisons, it is particularly noteworthy that acetyltransferase and benzoyltransferase specific activities did not peak at the same time and that the ratio of both enzymatic specific activities was not constant throughout culture on SSM.

Acetyltransferase specific activity was also compared to the specific production rate of thiolutin (Figure 9A). The time profile of acetyltransferase specific activity is tightly related

to the time profile of thiolutin specific production rate. Both acetyltransferase specific activity and thiolutin specific production rate peaked at 24 h and decreased until 72 h.

Similarly, BEP specific production rate is tightly related to the level of benzoyltransferase specific activity (Figure 9B). The peak of BEP specific production rate is associated with an increase in benzoyltransferase specific activity.

Expression of pyrrothine N-acyltransferase activities on SSM with organic acids

Acetyltransferase and benzoyltransferase specific activities were quantified during growth on SSM supplemented with benzoic acid at 1.25 mM (Figure 8B) or SSM supplemented with acetic acid at 5 mM (Figure 8C).

During growth on SSM with benzoic acid, benzoyltransferase specific activities were significantly higher than on SSM but the shape of the curve was not modified. Benzoyltransferase specific activity reached a maximal value of 20,881 $\mu\text{U mg}^{-1}$ of proteins at 48 h, i.e. 2.2 times higher than without benzoic acid. The second peak of benzoyltransferase specific activity observed at 96 h, like that on SSM, had a value of 15,920 $\mu\text{U mg}^{-1}$ of proteins, i.e. 1.8 times higher than without benzoic acid. On the contrary, acetyltransferase specific activities were not significantly modified by benzoic addition to culture medium.

Additionally, benzoyltransferase specific activity was also determined in cell-free extracts obtained after 48 h of growth, on SSM with different concentrations of benzoic acid (Figure 10A). Benzoyltransferase specific activity was 2 times higher with benzoic acid added to the culture medium than without, regardless of the benzoic acid concentration which range from 0.5 mM to 2.5 mM.

The time course of acetyltransferase specific activity was not significantly modified by acetic acid addition to SSM. Acetyltransferase specific activity reached a maximal value of 16,391 $\mu\text{U mg}^{-1}$ of protein at 24 h. Similarly, acetic acid had no effect on the time course of

benzoyltransferase specific activity. The maximal benzoyltransferase specific activity, 9,840 $\mu\text{U mg}^{-1}$ of protein, was reached at 48h.

Acetyltransferase specific activity was also determined in cell-free extracts obtained after 24 h of growth on SSM with different concentrations of acetic acid (Figure 10B). Acetic acid had no effect on acetyltransferase specific activity regardless of the concentration of acetic acid added to the medium in the range from 2.5 mM up to 7.5 mM.

DISCUSSION

Sa. algeriensis NRRL B-24137 has the ability to produce a wide range of dithiolopyrrolones with different radicals (R2s) depending on the precursors added to the culture medium (Lamari *et al.* 2002a, b, Bouras *et al.* 2006a, Bouras *et al.*, 2008). To have such ability to produce many dithiolopyrrolones with broad structural diversity, the microorganism must possess not only precursors but also a suitable enzymatic system with sufficient flexibility to attach a variety of R2 radicals on N₇. Data presented above provide evidence for the presence in the cell-free extract of *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 of an enzymatic activity that catalyzes acylation of pyrrothine nucleus on N₇ using acyl-CoA as acyl group donors. Especially, acetyl-CoA and benzoyl-CoA are respectively substrates of a pyrrothine N-acetyltransferase and N-benzoyltransferase enzymatic activity. These results suggest that the enzymatic reaction of pyrrothine acylation takes part in the dithiolopyrrolone biosynthetic pathway in *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 which is able to use acyl-CoA with very different structures (acetyl-CoA and benzoyl-CoA), as substrates to produce corresponding dithiolopyrrolones (thiolutin and BEP). The presence of a similar enzymatic activity, called holomycin synthase, catalyzing the amide bond formation between holothin (deacetyl-holomycin) and acetyl-CoA was already observed in the cell-free extracts of *S. clavuligerus* mutants, which are producers of holomycin (De La Fuente *et al.*, 2002). However, the enzyme responsible for this activity has not been purified yet. In contrast, the

existence of a N-benzoyltransferase activity involved in dithiolopyrrolone synthesis has never been reported before.

To understand the regulatory mechanisms exerted on these new enzymatic activities, the time courses of pyrrothine N-acetyltransferase and pyrrothine N-benzoyltransferase specific activities were determined in the cell-free extract of *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 and compared to the time courses of formation of thiolutin, BEP and growth.

Data shown in this study indicate that the dithiolopyrrolone production phase is partly growth-associated during culture of *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 on SSM and occurs during a decrease of specific growth rate. These results contrast with the traditional idea that the antibiotic production phase, called the idiophase, is separated from the growth phase, called the trophophase. However, several studies have shown that culture conditions supporting slow growth rates, e.g. nutritional limitations, can elicit an antibiotic production partly associated with growth (Martin and Demain 1980, Mc Dermott *et al.* 1993, Fazeli *et al.* 1995, Untrau-Taghian *et al.* 1995). Besides, studies on antibiotic production using chemostat cultures demonstrated that production can occur in association with growth although antibiotic production level is higher at low dilution rates (Vu-Trong and Gray 1981, Lebrihi *et al.* 1988, McIntyre *et al.* 1996, Pamboukian and Faciotti 2004).

In addition, a noticeable decrease of thiolutin concentration in the culture medium is observed after 72 h of growth on SSM. It is associated with a decrease in antimicrobial activities against *Muccor ramaniannus* and *Bacillus subtilis* (unpublished data, Lamari, L.). Thiolutin could undergo a physical or a chemical transformation (Yoshioka and Stella 2000). This compound contains in particular a disulfide bond which could be chemically broken with a relative ease (Parker and Kharasch 1959, Kice 1968). Thiolutin could also be converted enzymatically as already described in literature for other antibiotics. Enzymatic conversion could be either extracellular or intracellular after reassimilation of thiolutin by the cells

(Argoudelis and Mason 1969, Perlman and Sebek 1971). However, no mechanism of thiolutin transformation has been identified yet.

Pyrrothine N-acyltransferase activity was detected throughout the culture but was only overexpressed during a very short time that coincides with the peak of antibiotic productivity (i.e specific production rate). Such expression profiles have been previously observed for different antibiotic synthases (Ortmann *et al.* 1974; Nimi *et al.* 1981; Brana *et al.* 1985). It is an illustration, at the biochemical level, that antibiotic synthesis is very tightly regulated as it has been reported in the study of antibiotic gene clusters regulation in *Streptomyces* sp. (Cundliffe 2006; Rokem *et al.* 2007).

Sa. algeriensis NRRL B-24137 showed a valuable capability to produce new dithiolopyrrolone analogs when adequate precursors were added into the culture medium (Bouras *et al.*, 2008). Organic acid addition promoted the production of new dithiolopyrrolones possessing a R2 radical either identical to or different from organic acid. Specifically, benzoic acid or cinnamic acid addition led to BEP production and valeric acid addition resulted in valeryl-pyrrothine production (Bouras *et al.*, 2008).

In our study we showed that BEP was produced at very low level on SSM and we confirmed that BEP production was strongly increased by benzoic acid addition. Additionally, analysis of pyrrothine N- benzoyltransferase specific activity showed that specific activity was markedly enhanced during growth in presence of benzoic acid. Benzoic acid had no activator effect on benzoyltransferase specific activity when added in the benzoyltransferase assay (data not shown). These results suggest that stimulation of BEP production by benzoic acid is not only because of an additional precursor supply but also includes the induction of a biosynthetic enzymatic activity, i.e. pyrrothine N-benzoyltransferase, responsible for the transfer of benzoyl-CoA to pyrrothine.

Other antibiotic precursors that stimulate antibiotic production by inducing biosynthetic enzymes are known. A typical example is the stimulation of ergot alkaloid production by tryptophan. Krupinsky *et al.* (1976) showed that tryptophan enhanced the alkaloid production of ergot by inducing dimethylallyltryptophan (DMAT) synthetase, the first enzyme in the ergot alkaloid biosynthetic pathway.

In addition, earlier studies provided evidence that methionine, a precursor of cephalosporin C in *Cephalosporium acremonium*, induces enzymes of the cephalosporin C biosynthetic pathway such as δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase, isopenicillin N synthase, and deacetoxycephalosporin C synthase (Demain and Zhang 1998). Regulation seems to occur at the transcriptional level since the transcription of genes encoding the above enzymes was strongly increased by culture on methionine (Demain and Zhang 1998). Lastly, it has been shown that some enzymes involved in pathways supplying antibiotic precursors, especially amino acid catabolism pathways, are induced by their substrate. Rius *et al.* (1996) observed that lysine induced the L-Lysine ϵ -aminotransferase (LAT), an enzyme involved in the conversion of L-lysine (Lys) to L- α -aminoadipic acid (Aaa), a direct precursor of cephalosporins in *Streptomyces clavuligerus*. Besides, valine deshydrogenase (VDH), the first enzyme of valine catabolism that provides N-butyrate, propionate and methyl-malonate for macrolide biosynthesis is induced by valine in *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces fradiae* and *Streptomyces avermitilis* (Nguyen *et al.* 1995a, b).

By contrast, acetic acid addition to the culture medium depressed thiolutin production despite the fact that it is a potential precursor for thiolutin synthesis. Our assays of the pyrrothine N-acetyltransferase activity showed that acetic acid had no effect on its level of activity, supporting the idea that the decrease in thiolutin production was not due to repression of this enzymatic activity. Acetic acid had no inhibitor effect on acetyltransferase specific

activity when added in the acetyltransferase assay (data not shown). As a consequence, the negative effect of acetate addition on thiolutin specific production remains to be elucidated but some hypothetical mechanisms can be put forth. Possible explanations include an inhibition of the acetyltransferase activity by a change in intracellular pH, a negative effect of acetate on another enzyme of the biosynthetic pathway, or on enzymes involved in a pathway supplying antibiotic precursors. Modifications of transport systems or redirection of thiolutin precursors to primary metabolism might also account for a decrease in thiolutin production in the presence of acetate but it is unlikely since growth was not affected by acetate addition.

Lastly, some of the results presented in this study support the idea that the transfer reactions of acetyl-CoA and benzoyl-CoA on pyrrothine are not catalyzed by the same enzyme. The existence of a unique enzyme could not account for the variability in the ratio between both specific activities throughout the culture. Additionally, this idea is strengthened by the finding that the benzoyltransferase activity level is specifically increased during culture with benzoic acid whereas acetyltransferase activity is not modified.

The purification of enzymes catalyzing the transfer reaction of acetyl-CoA and benzoyl-CoA to pyrrothine is in progress in our laboratory in order to confirm the hypothesis that two different enzymes are involved. Additionally, the amino acid sequence determination of enzyme(s) would be an essential starting point for gene identification and further studies on biosynthetic pathway regulation. Further studies should be also carried out on *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 nutritional requirements and on its behaviour in a controlled environment within a bioreactor to better understand the conditions of antibiotic onset.

This study provides evidence for the presence of a pyrrothine N-acyltransferase activity in the cell-free extract of *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 involved in the dithiolopyrrolone biosynthetic pathway. Our work also suggests that enhancement of BEP production by *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 in the presence of benzoic acid is partly due to

an increase in pyrrothine N-benzoyltransferase specific activity. As a consequence, this study provides new insights into dithiolopyrrolone synthesis, especially into its regulation and also gives valuable experimental tools to further our understanding of the dithiolopyrrolone biosynthetic pathway.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank the Professor Arnold L. Demain (Drew University, Madison, New Jersey, USA) for his critical reading of the manuscript and valuable suggestions.

REFERENCES

- Argoudelis, A.D. and Mason, D.J. (1969) Microbial transformation of antibiotics. I. Production of lincomycin sulfoxide and 1-demethylthio-1-hydroxylincomycin by *S. lincolnensis*. *J Antibiot (Tokyo)* **22**, 289-291.
- Bhate, D.S., Hulyalkar, R.K. and Menon S.K. (1960) Isolation of iso-butyropyrrrothine along with thiolutin and aureothricin from a *Streptomyces* sp.. *Experientia* **16**, 504-505.
- Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N. and Lebrihi, A. (2006a) Effect of amino acids containing sulfur on dithiolopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *J Appl Microbiol* **100**, 390-397.
- Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N. and Lebrihi A. (2006b) Nutritional requirements for the production of dithiolopyrrolones by *Saccharothrix algeriensis* NRRLB-24137. *Enzyme Microb Technol* **39**, 1423-1429.
- Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N. and Lebrihi A (2007) Influence on dithiolopyrrolone antibiotic production by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRLB-24137. *Process Biochem* **42**, 925-933.
- Bouras, N., Merrouche, R., Lamari, L., Mathieu, F., Sabaou, N. and Lebrihi, A. (2008) Precursor-directed biosynthesis of new dithiolopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochem* **43**, 1244-1252.
- Brana, A.F., Wolf, S. and Demain A.L. (1985) Ammonium repression of cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. *Can J Microbiol* **31**, 736-743.
- Büchi, G. and Lukas, G. (1964) A total synthesis of holomycin. *J Am Chem Soc* **86**, 5654-5658.

Celmer, W.D., Tanner, F.W., Harfenist, M., Lees, T.M. and Solomons I.A. (1952) Characterization of antibiotic thiolutin and its relationship with aureothricin. *J Am Chem Soc* **74**, 6304-6305.

Chen, G., Li, J., Webster, J. and Li B. Patent US2006074125. April 6th 2006.

Cundliffe, E. (2006) Antibiotic production by actinomycetes: the janus faces of regulation. *J Ind Microbiol Biotechnol* **33**, 500-506.

De la Fuente, A., Lorenzana L.M., Martin, J.F. and Liras P. (2002). Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathway. *J Bacteriol* **184**, 6559-6565.

Demain, A.L. and Zhang, J. (1998) Cephalosporin C production by *Cephalosporium acremonium*: the methionine story. *Crit Rev Biotechnol* **18**, 283-294.

Ellis, J.E., Fried, J.H., Harrison, I.T., Rapp, E. and Ross, C.H. (1977) Synthesis of holomycin and derivatives. *J Org Chem* **42**, 2891-2893.

Fazeli, R.M., Cove, J.H. and Baumberg, S. (1995) Physiological factors affecting streptomycin production by *Streptomyces griseus* ATCC 12475 in batch and continuous culture. *FEMS Microbiol Lett* **126**, 55-61.

Furumai, T., Takeda, K. and Okanishi M. (1982) Function of plasmids in the production of aureothricin. I. Elimination of plasmids and alteration of phenotypes caused by protoplast regeneration in *Streptomyces kasugaensis*. *J Antibiot (Tokyo)* **35**, 1367-1373.

Guo, Y., Chen, G. and Bin, L. Novel dithiolopyrrolones and their therapeutical applications. Patent WO2008038175. April 3rd 2008.

Hagio, K. and Yoneda, N. (1974) Total syntheses of holomycin, thiolutin and aureothricin. *Bull Chem Soc Jpn* **47**, 1484-1489.

Hjelmgaard, T., Givskov, M. and Nielsen, J. (2007) Expedient total synthesis of pyrrothine natural products and analogs. *Org Biomol Chem* **5**, 344-348.

Kice, J.L. (1968) Electrophilic and nucleophilic catalysis of the scission of the sulfur-sulfur bond. *Acc Chem Res* **1**, 58-64.

Krupinski, V. M., Robbers, J. E. and Floss, H.G. (1976) Physiological study of ergot: induction of alkaloid synthesis by tryptophan at enzymatic level. *J Bacteriol* **125**, 158-165.

- Lamari, L., Zitouni, A., Boudjella, H., Badjin B., Sabaou, N., Lebrihi, A., Lefebvre, G., Seguin, E. and Tillequin, F. (2002a) New dithiolopyrrolones antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233 : I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* **55**, 696-701.
- Lamari, L., Zitouni, A., Dob, T., Sabaou, N., Lebrihi, A., Germain, P., Seguin, E. and Tillequin F. (2002b) New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physiochemical properties and structure elucidation. *J Antibiot (Tokyo)* **55**, 702-707.
- Lebrihi, A., Lefebvre, G. and Germain, P. (1988) A study on the regulation of cephamycin C and expandase biosynthesis by *Streptomyces clavuligerus* in continuous and batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol* **28**, 39-43.
- Li, J., Chen, G., Webster, J.M. (1995) Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. *J Nat Prod* **58**, 1081-1086.
- Li, B., Lyle, M.P.A., Chen, G., Li, J., Hu, K., Tang, L., Alaoui-Jamali, M.A. and Webster, J. (2007) Substituted 6-amino-4*H*-[1,2]dithiolo[4,3-*b*]pyrrol-5-ones: Synthesis, structure–activity relationships, and cytotoxic activity on selected human cancer cell lines. *Bioorg Med Chem* **15**, 4601-4608.
- Martin, J.F. and Demain, A.L. (1980) Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol rev* **44**, 230-251.
- McDermott, J.F., Lethbridge, G. and Bushell, M.E. (1993) Estimation of the kinetic constants and elucidation of trends in growth and erythromycin production in batch and continuous cultures of *Saccharopolyspora erythraea* using curve-fitting techniques. *Enzyme Microb Technol* **15**, 657-663.
- Mc Inerney, B.V., Gregson, R.P., Lacey, M.J., Akhurst, R.J., Lyons, G.R., Rhodes, S.H., Smith, D.R., Engelhardt, L.M. and White, A.H. (1991) Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., part I dithiolopyrrolone derivatives with antibiotic activity. *J Nat Prod* **54**: 774-784.
- McIntyre, J.J., Bull, A.T. and Bunch A.W. (1996) Vancomycin production in batch and continuous culture. *Biotechnol Bioeng* **49**, 412-420.
- Minamigushi, K., Kumagai, H., Masuda, T., Kawada, M., Ishizuka, M. and Takeushi, T. (2001) Thiolutin, an inhibitor of huvec adhesion to vitronectin, reduces paxillin in huvecs and suppresses tumor cell-induced angiogenesis. *Int J Cancer* **93**, 307-316.
- Nguyen, K.T., Nguyen, L.T. and Běhal, V. (1995a) The induction of valine deshydrogenase activity from *Streptomyces* by L-valine is not repressed by ammonium. *Biotechnol Lett* **17**, 31-34.
- Nguyen, K.T., Nguyen, L.T. and Běhal, V. (1995b) The avermectin-producing *Streptomyces avermitilis* possesses an inducible valine deshydrogenase. *Biotechnol Lett* **17**, 151-156.

Nimi, O., Kubota, H. and Sugiyama, M. (1981) Effect of arginine on gramicidin S biosynthesis by *Bacillus brevis*. *J antibiot (Tokyo)* **35**, 615-621.

Ninomiya, Y.T., Yamada, Y., Shirai, H., Onitsuka, M., Suhara, Y. and Maruyama, H.B. (1980) Biochemically active substances from microorganisms. V. Pyrrothines, potent platelet aggregation inhibitors of microbial origin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **28**, 3157-3162.

Oliva, B., O'Neill, A., Wilson, J.M., O'Hanlon, P.J. and Chopra, I. (2001) Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 532-539.

Ortmann, R., Matern, U. and Grisebach, H. (1974) NADPH-dependent formation of thymidine diphosphodihydrostreptose from Thymidine diphospho-D-glucose in a cell-free system from *Streptomyces griseus* and its correlation with Streptomycin biosynthesis. *Eur J Biochem* **43**, 265-271.

Pamboukian, C.R.D. and Facciotti, M.C.R. (2004) Production of the antitumoral retamycin during continuous fermentations of *Streptomyces olindensis*. *Process Biochem* **39**, 2249-2255.

Parker, A.J. and Karasch, N. (1959) The scission of the sulfur-sulfur bond. *Chem Rev* **59**, 583-628.

Perlman, D. and Sebek, O.K. (1971) Microbial transformations of antibiotics. *Pure Appl Chem* **28**, 637-648.

Rius, N., Maeda, K., Demain, A.L. (1996) Induction of L-lysine ϵ -aminotransferase by L-lysine in *Streptomyces clavuligerus*, producer of cephalosporins. *FEMS Microbiol Lett* **144**, 207-211.

Rokem, J.S., Eliasson Lantz, A. and Nielsen J. (2007) Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Nat Prod Rep* **24**, 1262-1287.

Shiozawa, H., Kagasaki, T., Kinoshita, T., Haruyama, H., Domon, H., Utsui, Y., Kodama, K. and Takahashi, S. (1993) Thiomarinol, a new hybrid antimicrobial antibiotic produced by a marine bacterium: fermentation, isolation, structure, and antimicrobial activity. *J Antibiot (Tokyo)* **46**, 1834-1842.

Stahl, P., Seidel, H., Von der Eltz, H., Wilhelms, O-H. and Roesch, A. Pyrrothine derivatives and pharmaceutical use thereof. Patent US4760077. July 26th 1988.

Untrau-Taghian, S., Lebrhi, A., Germain, P. and Lefebvre G. (1995) Influence of growth rate and precursor availability on spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. *Can J Microbiol* **41**, 157-162.

Vu-Trong, K. and Gray, P.P. (1981) Continuous-culture studies on the regulation of tylosin biosynthesis. *Biotechnol Bioeng* **24**, 1093-1103.

Webster, J.M., Li, J. and Chen, G. Anticancer properties of dithiolopyrrolones. Patent US6020360. February 1st 2000.

Yoshioka, S. and Stella, V.J. (2001) Stability of drugs and dosage forms. 272 pp. Paris: Springer.

Zitouni, A., Boudjella, H., Lamari, L., Badji, B., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Sabaou, N. (2005) *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterisation of antibiotics. *Res Microbiol* **156**, 984-993.

FIGURES

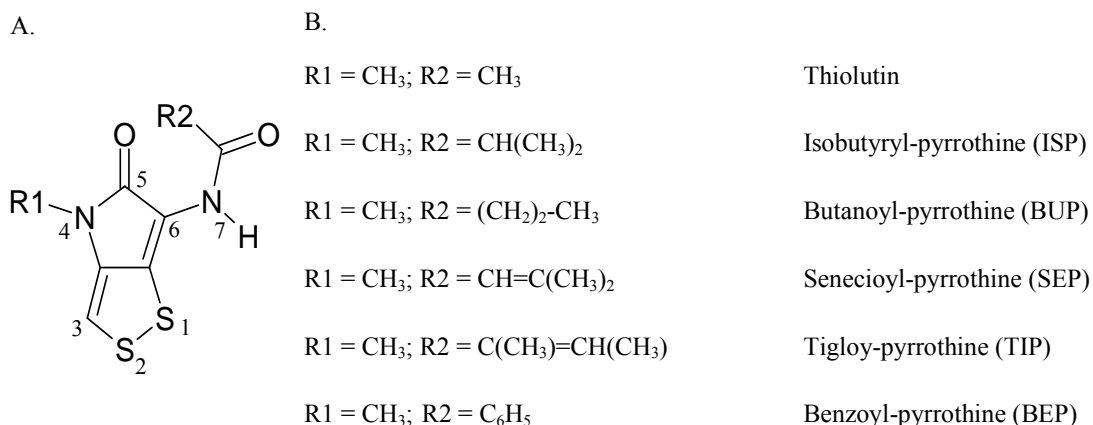


Figure 2 A. General structure of dithiopyrrolones: the pyrrolinonodithiole nucleus and its radicals R1 and R2. B. Structure of dithiopyrrolones produced by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137.

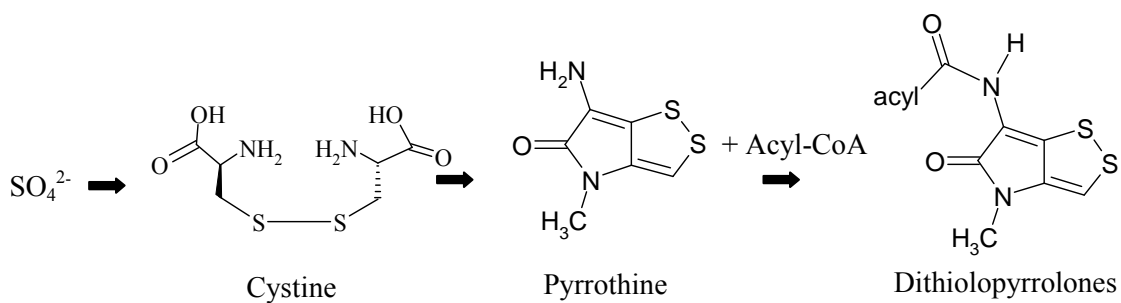


Figure 3 Dithiopyrrolone biosynthetic pathway (according to Furumai *et al.* 1982)

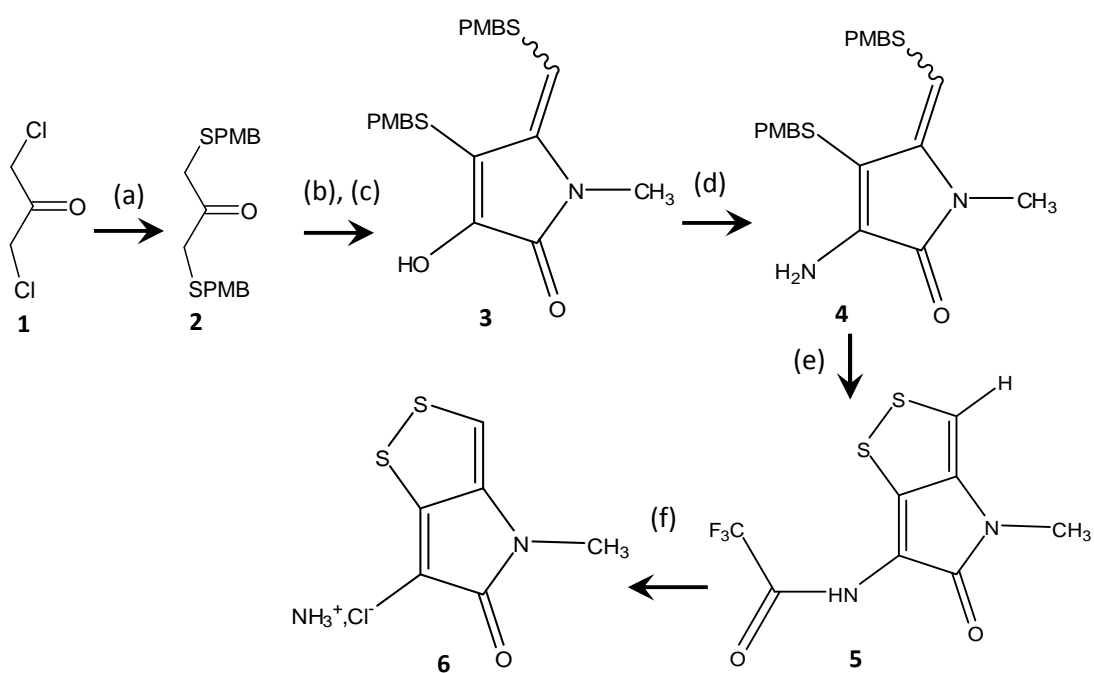


Figure 4 Pyrrothine (6) synthesis adapted from Hjelmgaard *et al.* (2007) – Steps (a) sodium methoxide (NaOMe, 2eq.), p-methoxybenzylthiol (PMBSH, 2eq.), ethanol, reflux, 100%, (b) methylamine (MeNH₂), Et₃N, THF, TiCl₄, 0°C to reflux (c) oxalyl chloride (2eq.), Et₃N, THF, 31.4% (d) Ammonium acetate, ethanol, reflux, 53.6 % (e) m-cresol (10 eq.), TFA, reflux, 42.3 % (f) HCl(aq), MeOH, reflux, 49.6 %

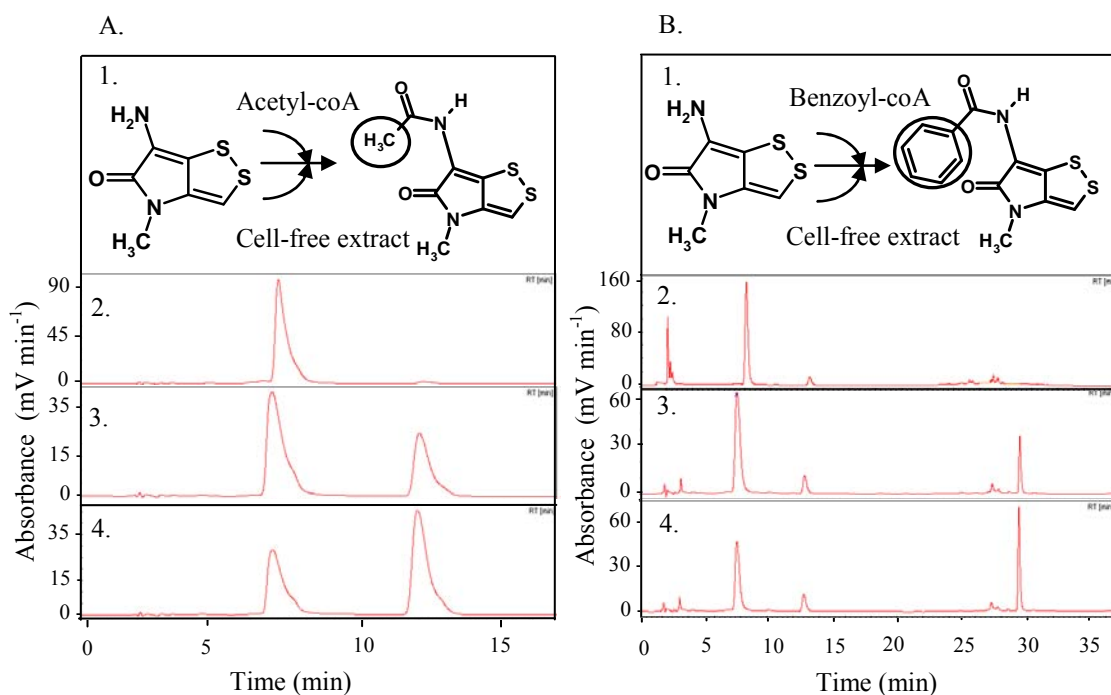


Figure 5 Conversion of pyrrothine to dithiopyrrolones: A. Conversion of pyrrothine (Rt = 7 min) to thiolutin (Rt = 12.3 min) and B. Conversion of pyrrothine (Rt = 8 min) to benzoyl-pyrrothine (Rt = 29 min). (1.) Reaction scheme. (2. to 4.) Dithiopyrrolone and pyrrothine present in the reaction at 0 (2.), 5 (3.) and 10 min (4.), as measured by HPLC. Absorbance is given in mV min⁻¹ and time in minutes.

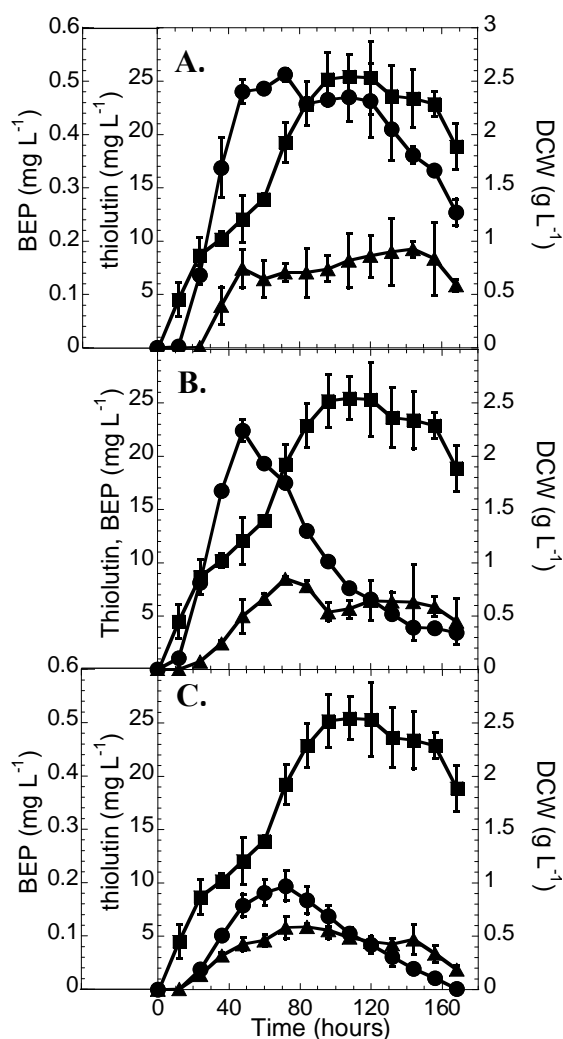


Figure 6 Time course of dry cell weight (DCW, ■), production of thiolutin (●), and production of benzoyl-pyrrothine (BEP, ▲) during cultures of *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 on: A. SSM, B. SSM supplemented with benzoic acid at 1.25 mM, C. SSM supplemented with acetic acid at 5 mM. Dry cell weight (DCW) is given in g L^{-1} , antibiotic productions in mg L^{-1} and time in hours.

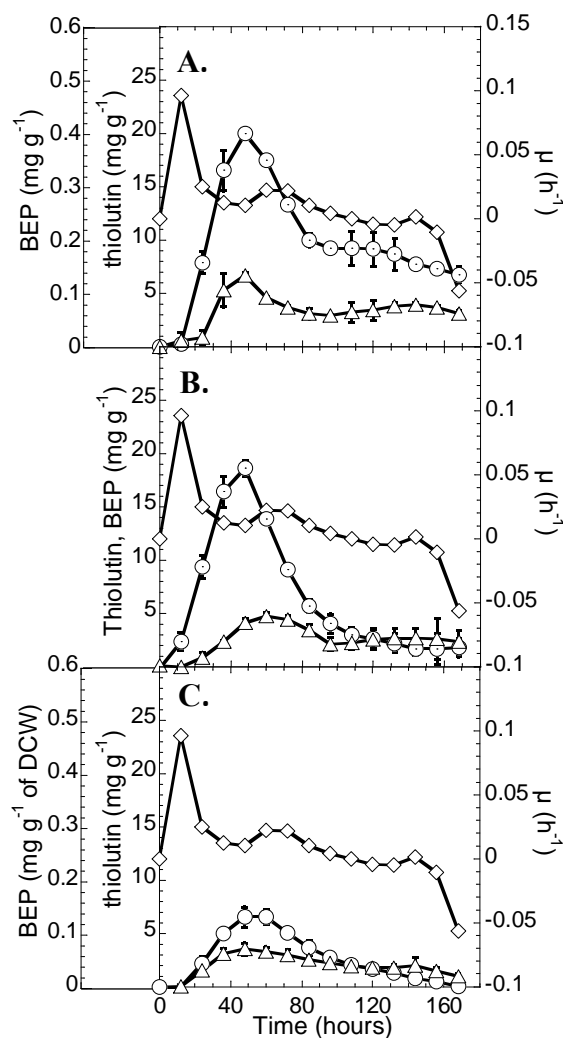


Figure 7 Time course of specific growth rate (μ , ◇), specific production of thiolutin (○), and specific production of benzoyl-pyrrothine (BEP, △) during cultures of *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 on: A. SSM, B. SSM supplemented with benzoic acid at 1.25 mM, C. SSM supplemented with acetic acid at 5 mM. Specific growth rate is given in h^{-1} , specific productions in mg g^{-1} of DCW and time in hours.

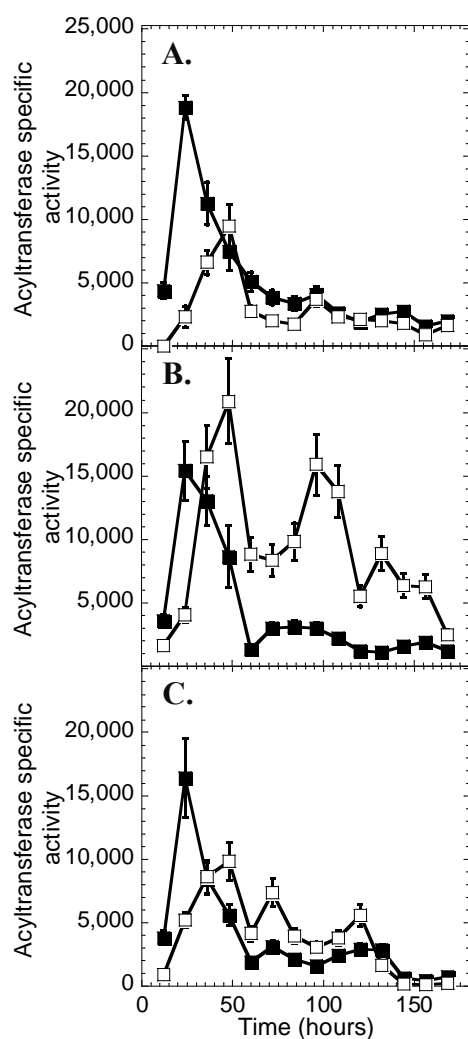


Figure 8 Time course of pyrrothine N-acyltransferase (■) and pyrrothine N-benzoyltransferase (□) specific activities during cultures of *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 on: A. SSM, B. SSM supplemented with benzoic acid at 1.25 mM, C. SSM supplemented with acetic acid at 5 mM. Specific activities are given in $\mu\text{U mg}^{-1}$ of proteins and time in hours.

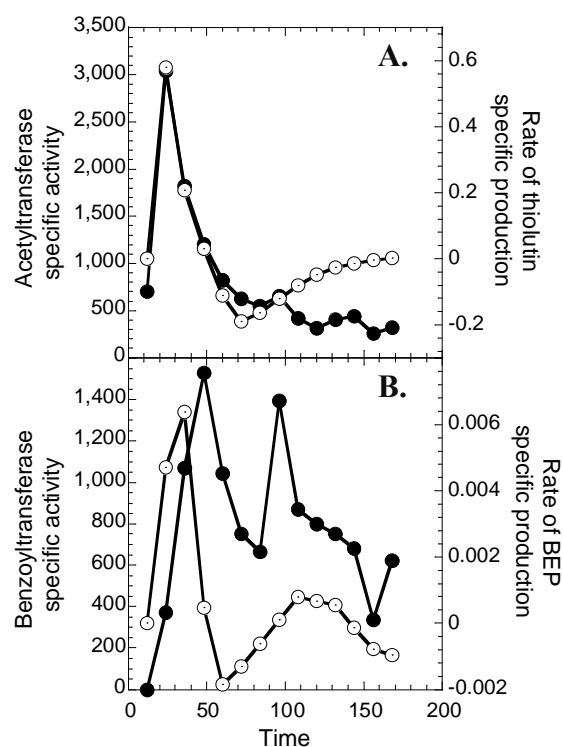


Figure 9 Time course of pyrrothine N-acyltransferase specific activity (●) and rate of average dithiolopyrrolone specific production (○) on SSM: A. Comparison of acetyltransferase specific activity and rate of average thiolutin specific production, B. Comparison of benzoyltransferase specific activity and rate of average BEP specific production. Pyrrothine N-acyltransferase specific activities are given in $\mu\text{U g}^{-1}$ of DCW and rates of average dithiolopyrrolone specific production in $\text{mg h}^{-1} \text{g}^{-1}$ of DCW. Time is given in hours.

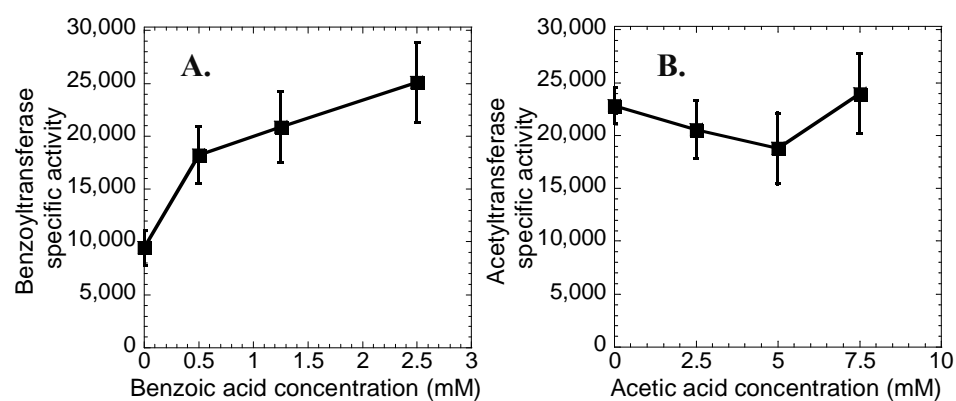


Figure 10 Influence of acid concentration on N-pyrrothine acyltransferase activities: A. Influence of benzoic acid concentration in SSM on pyrrothine N-benzoyltransferase specific activity at 48h. B. Influence of acetic acid concentration in SSM on pyrrothine N-acetyltransferase specific activity at 24h. Specific enzymatic activities are given in $\mu\text{U mg}^{-1}$ of proteins and acid concentrations in mM.